

ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHESE AUS HEFE

**Modellsubstrate für die Dehydratase, Isolierung der
Acetyltransferase und der Dehydratase durch
limitierte Proteolyse des Multienzymkomplexes**

Thomas Schmitt

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0007

ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHETASE
AUS HEFE

Modellsubstrate für die Dehydratase,
Isolierung der Acetyltransferase und
der Dehydratase durch limitierte
Proteolyse des Multienzymkomplexes

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Thomas Schmitt

München 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.6.1980

in the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

Meinem Lehrer Feodor Lynen

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the
the morning, and I was not surprised to find the

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried von Juni 1976 bis August 1979 durchgeführt.

Nach dem tragischen Tod von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am 6. August 1979 wurde die Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Dieter Oesterheld mit der Unterstützung von Herrn Professor Dr. Guido Hartmann bis Oktober 1979 in Martinsried zu Ende geführt.

Herrn Professor Dr. Feodor Lynen schulde ich für seine Unterstützung und sein förderndes Interesse, die er dieser Arbeit und mir persönlich stets gewährte, großen Dank.

Die große Persönlichkeit meines verehrten Lehrers hat mich und meine Arbeit während dieser Zeit stark beeinflusst.

Herrn Professor Dr. Guido Hartmann und Herrn Professor Dr. Dieter Oesterheld danke ich herzlich für die großzügige Unterstützung.

Für die zuverlässige und geschickte Mitarbeit danke ich Fräulein Erika Ringelmann von Juni 1977 bis Juli 1979, Fräulein Cornelia Verfürth von Oktober 1978 bis August 1979, und Fräulein Irene Maier im Oktober 1979.

Ferner möchte ich mich bei vielen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Biochemie und des Biochemischen Instituts der Universität München für die wertvollen Anregungen und für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. Georg-Burkhard Kresze, Herrn Professor Dr. Dieter Oesterheld und Herrn Dr. Felix Wieland für die kritischen Diskussionen.

Herrn Dr. Uwe Jakubowski, Herrn Dr. Harro Prieß und Herrn Dr. Elmar Sieß gilt mein Dank für die anregende Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Biosynthese der Fettsäuren	1
1.2. Die Fettsäuresynthetase aus Hefe	2
1.3. Die dreidimensionale Struktur der Fettsäuresynthetase aus Hefe	4
1.4. Multifunktionelle Proteine	6
2. Modellsubstrate für die Dehydratase der Fettsäuresynthetase	8
2.1. Synthesen der Modellsubstrate	9
2.1.1. Organisch-präparative Synthesen der D,L- β -Hydroxyacylthioester	9
2.1.2. Enzymatische Synthese von D (-)- β -Hydroxybutyryl-S-N-Acetylcysteamin	10
2.2. Messung der Dehydrataseaktivität	10
2.3. Spezifität der Dehydratase	13
2.3.1. Stereospezifität	13
2.3.2. Kettenlängenspezifität	14
2.3.3. Spezifität der Thiolkomponente	17
2.4. Stabilität des dehydratisierenden Enzyms	18
2.5. Kontrollexperimente zur Messung der Dehydrataseaktivität	19
2.6. Weitere Methoden zur Messung der Dehydrataseaktivität	20
2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	21
3. Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase aus Hefe	23
3.1. Vorversuche zur Anreicherung von enzymatisch aktiven Bruchstücken der Polypeptidketten α und β	24
3.1.1. Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase mit spezifischen Proteasen	25

3.1.2.	Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase mit unspezifischen Proteasen	25
3.2.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	31
4.	Isolierung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente aus Fettsäuresynthetase nach limitierter Proteolyse	32
4.1.	Hydrolyse der Fettsäuresynthetase aus Hefe mit Elastase	32
4.2.	Anreicherung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	33
4.2.1.	Entfernung ungespaltener Fettsäuresynthetase durch Ultrazentrifugation	33
4.2.2.	Auftrennung des Elastasespaltgemisches durch Gelfiltration	33
4.2.3.	Auftrennung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente durch Chromatographie an Hydroxylapatit	35
4.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	38
5.	Charakterisierung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	41
5.1.	Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase- und Dehydratasekomponente	41
5.1.1.	Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts	41
5.1.2.	Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
5.1.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	42
5.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	44
5.2.1.	Acetyltransferasekomponente	44
5.2.2.	Dehydratasekomponente	48
5.2.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	49
5.3.	Bestimmung des isoelektrischen Punkts	51
5.3.1.	Acetyltransferasekomponente	51
5.3.2.	Dehydratasekomponente	53

5.4.	Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für Acetyl-CoA an der Acetyltransferasekomponente	54
5.4.1.	Radioaktive Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen	55
5.4.2.	Optische Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität mit DTNB	58
5.4.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	62
5.5.	Endgruppenbestimmung des N-Terminus der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	63
5.5.1.	Ergebnisse der N-terminalen Analyse	63
5.5.2.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	63
6.	Untersuchungen zur Struktur der Fettsäuresynthetase	65
6.1.	Immunologische Untersuchungen	65
6.1.1.	Immunologische Lokalisierung der Acetyltransferase und der Dehydratase auf den Untereinheiten der Fettsäuresynthetase	65
6.1.1.1.	Herstellung von Kaninchenantikörpern gegen die Acetyltransferasekomponente (ATC) und die Dehydratasekomponente (DHC) der Fettsäuresynthetase	65
6.1.1.2.	Spezifität der Antikörper	65
6.1.1.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	69
6.1.2.	Bindungsorte der Antikörper gegen die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente am nativen Enzymkomplex	70
6.1.2.1.	Hemmverhalten der gereinigten Antikörper gegenüber nativer Fettsäuresynthetase	70
6.1.2.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an nativer Fettsäuresynthetase mit den Antikörpern gegen die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente	72
6.1.2.3.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	76
6.2.	Lokalisierung der Transferasen auf der Polypeptidkette β	77
6.3.	Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie	79

6.4.	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Struktur der Fettsäuresynthetase	80
7.	Experimenteller Teil	84
7.1.	Allgemeines	84
7.1.1.1.	Verwendete Geräte	84
7.1.2.	Materialien	85
7.1.3.	Allgemeine analytische Methoden	86
7.1.3.1.	Proteinbestimmung	86
7.1.3.2.	Radioaktivitätsmessungen	87
7.1.3.3.	Autoradiographie der Polyacrylamidgele	87
7.1.3.4.	Gehaltsbestimmung Thioester und Thiole	87
7.1.3.5.	Analytische Gelelektrophoresen	88
	a) Diskgelelektrophoresen	
	b) SDS-Gelelektrophoresen	
7.1.4.	Anreicherung der Fettsäuresynthetase und Messung der enzymatischen Aktivitäten	88
7.1.4.1.	Anreicherung	88
7.1.4.2.	Messung der enzymatischen Aktivitäten	89
	a) Messung der Gesamtsynthese	89
	b) Messung der Acetyltransferase	89
	c) Messung der Malonyltransferase	90
	d) Messung der β -Ketoacylreduktase	90
	e) Messung der β -Hydroxyacyldehydratase	90
	f) Messung der Enoylreduktase	91
	g) Messung der Deacylase	91
7.1.5.	Säulenchromatographie	93
7.1.5.1.	Allgemeine Verfahren	93
7.1.5.2.	Gelfiltration	93
7.1.5.3.	Chromatographie an Hydroxylapatit	93
7.2.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 2	94
7.2.1.	Synthesen der Modellsubstrate	94
7.2.1.1.	Organisch-präparative Synthesen der D,L- β -Hydroxyacylthioester und S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin	94
	a) Synthesen der freien Säuren	94
	b) Synthesen der Thiole	94
	c) Synthesen der Thioester	95

7.2.1.2.	Enzymatische Synthese von D(-)β-Hydroxybutyryl- N-Acetylcysteamin	96
7.2.1.3.	Reinheitskriterien der Modellsubstrate	97
	a) UV-Spektren	
	b) Schmelzpunktsbestimmung	
	d) Dünnschichtchromatographie	
7.2.1.4	Identifizierung der Modellsubstrate durch ¹ H-NMR-Spektroskopie	99
7.2.2.	Messung der Dehydrataseaktivität der Modell- substrate	100
7.2.2.1.	Dehydrataseaktivität in Abhängigkeit der THF-Konzentration	100
7.2.2.2.	Messung des pH-Wirkungsoptimums der Dehydra- tase	100
7.2.2.3.	Anfertigung der Substratabhängigkeitskurven N-Acetylcysteaminderivate Pantetheinderivate	100
7.2.2.4.	Stabilität des dehydratisierenden Enzyms	101
7.2.2.5.	Kontrollexperimente zur Messung der Dehy- drataseaktivität	102
	a) Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Dehydratisierung	102
	b) Enzymabhängigkeit der Dehydratisierungs- geschwindigkeit	102
7.3.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 3: Vorversuche zur Anreicherung enzymatisch aktiver Bruchstücke	103
	1. Inkubationsansatz	103
	2. Kinetik der Verdauung	104
7.4.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 4: Isolierung der Acetyltransferase- und der De- Dehydratasekomponente aus Fettsäuresynthetase nach limitierter Proteolyse	106
7.4.1.	Hydrolyse der Fettsäuresynthetase mit Elas- tase	106
7.4.2.	Entfernung ungespaltener Fettsäuresynthetase durch Ultrazentrifugation	107

7.4.3.	Auftrennung des Elastasespaltgemisches durch Gelfiltration	107
7.4.4.	Auftrennung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente durch Chromatographie an Hydroxylapatit	108
7.5.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 5:	109
7.5.1.	Molekulargewichtsbestimmung	109
7.5.1.1.	Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts	109
7.5.1.2.	Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	109
7.5.2.	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	110
7.5.2.1.	Acetyltransferasekomponente	110
7.5.2.2.	Dehydratasekomponente	110
7.5.3.	Bestimmung des isoelektrischen Punkts	
7.5.3.1.	Isoelektrische Säulenfokussierung	110
7.5.3.2.	Isoelektrische Flachbettfokussierung	111
7.5.4.	Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für Acetyl-CoA an der Acetyltransferasekomponente	112
7.5.4.1.	Radioaktive Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen	112
7.5.4.2.	Optische Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität mit DTNB	114
7.5.5.	Endgruppenbestimmung des N-Terminus der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente	115
7.6.	Versuchsbeschreibung zu Kapitel 6	116
7.6.1.	Immunologische Untersuchungen	116
7.6.1.1.	Immunologische Lokalisierung der Acetyltransferase und der Dehydratase auf den Untereinheiten der Fettsäuresynthetase	116
	1. Herstellung von Kaninchenantikörpern gegen ATC und DHC aus FSS und ACP aus K. aerogenes	116
	2. Isolierung der IgG	116
	3. Ouchterlony-Diffusion	117

7.6.1.2. Bindungsorte der Antikörper gegen ATC und DHC an nativer FSS	117
1. Präzipitationsverhalten	117
2. Hemmverhalten	118
3. Elektronenmikroskopische Untersuchung an nativer FSS mit Anti-ATC-IgG und Anti-DHC-IgG	118
a) Anreicherung von FSS-IgG-FSS-Komplexen	118
b) Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie	118
7.6.2. Lokalisierung der Transferasen auf der Polypeptidkette β	119
1. Radioaktive Beladung der Acetyltransferase	119
2. Radioaktive Beladung der Malonyltransferase	119
7.6.3. Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie	120
Zusammenfassung	121
Literaturverzeichnis	124
Lebenslauf	130

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AcAla ₃ -p-Nitroanilid	N-Acetyl-L-Alaninyl-L-Alaninyl-L-Alaninyl-p-Nitroanilid
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ACP	acyl carrier protein
Äq	Äquivalent
ATC	Acetyltransferasekomponente der FSS
c	Konzentration
¹⁴ C	Kohlenstoffisotop 14
Ci	Curie
CoA, CoA-SH	Coenzym A
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
CS	Citrat-Synthase
Cys	Cystein
DHC	Dehydratasekomponente der FSS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Dansyl-
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E, mE	Enzymeinheit*, -millieinheit
ΔE _{x nm}	Extinktionsänderung bei x nm
F _p	Schmelzpunkt
FSS	Fettsäuresynthetase
Glu	Glutaminsäure
Gu/HCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
IgG	Immunoglobulin G
K-EDTA	Kalium-Äthylendiamintetraacetat
K _M	Michaelis-Konstante
K-PO ₄	Kalium-Phosphat-Puffer (angegebene Molarität gilt für Phosphat)
Mal-CoA	Malonyl-Coenzym A
MDH	Malatdehydrogenase
MG	Molekulargewicht
min	Minute

* In dieser Arbeit wurde statt der Maßeinheit Katal (Mol Substratumsatz/sec) die Enzymeinheit E (μMol Substratumsatz/min) verwendet.

- IX -

NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid- phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid- phosphat, reduziert
NMR	magnetische Kernresonanz
PAS	Perameisensäure
PMS	Phenylmethansulfonylflorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PTA	Phosphotransacetylase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-dodecylsulfat
sec	Sekunde
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl- Puffer (angegebene Molarität gilt für Tris
% v/v	Volumenprozent
Val	Valin
v _{max}	maximale Geschwindigkeit (Michaelis- Menten-Konstante)
% w/w	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1. Die de novo-Biosynthese der gesättigten Fettsäuren

Man kann die Fettsäure-synthetisierenden Enzyme in lebenden Organismen in zwei Gruppen einteilen:

Die Systeme der einen Gruppe bestehen aus einzelnen Enzymen niederen Molekulargewichts, die als monofunktionelle Einheiten isoliert werden können. Bekannte Beispiele dieser Gruppe finden sich in Bakterien (E.coli) und in Pflanzen (Avocado mesocarp).

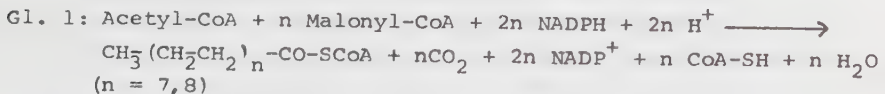
Die fettsäuresynthetisierenden Enzyme der anderen Gruppe liegen als Multienzymkomplexe vor. Wir finden diese Komplexe in tierischen Geweben und in eukaryontischen Mikroorganismen.

Die kovalente Verknüpfung von Einzelenzymen zu multifunktionellen Proteinen, die ihrerseits zu einem Komplex zusammengelagert sind, bietet folgende Vorteile:

Minimale Diffusionswege der Substrate und Abschirmung des Biosyntheseprozesses gegen Seitenreaktionen.

Das Molekulargewicht dieser Komplexe reicht von $0,4 \times 10^6$ bis $2-3 \times 10^6$ Dalton.

Das Studium des Multienzymkomplexes der Fettsäuresynthetase aus Hefe lieferte grundlegende Beiträge zum Verständnis der Fettsäurebiosynthese (1). So konnte 1961 im Lynen'schen Laboratorium die Gesamtgleichung der Fettsäurebiosynthese (Gl. 1) aufgestellt werden und die beteiligten Teilreaktionen postuliert werden (1).



Mit Hilfe von Modells substraten war es Lynen möglich, die einzelnen Reaktionsschritte am Hefeenzym aufzuklären
Abb. 1 (2).

Bei welchen Organismen auch immer die Biosynthese von Fettsäuren erforscht wurde, die grundlegenden chemischen Prozesse erwiesen sich als dieselben (Abb. 1).

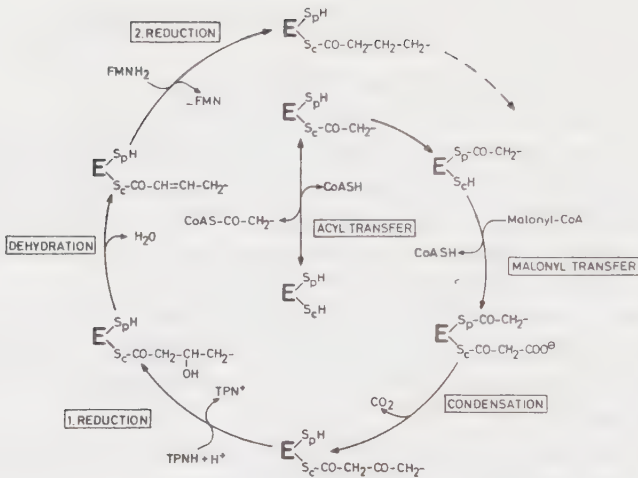


Abb. 1: Schema der Fettsäurebiosynthese nach Lynen (2)

1.2. Die Fettsäuresynthetase aus Hefe

Am Multienzymkomplex aus Hefe wird der Acetylrest vom Acetyl-Coenzym A auf die sogenannte zentrale SH-Gruppe übertragen. Diese Gruppe enthält das 4'-Phosphopantethein als prosthetischen Teil des integrierten Acyl Carrier Proteins (ACP). Der kovalent gebundene Acetylrest gelangt von dort auf die periphere SH-Gruppe, die als aktives Zentrum des kondensierenden Teilenzym ein Cystein enthält. Auf die wieder frei gewordene zentrale SH-Gruppe wird jetzt der Malonylrest vom Malonyl-CoA übertragen. Der über das 4'-Phosphopantethein kovalent gebundene Acylrest kann kraft der Länge (20 Å) (4) und der Beweglichkeit der prosthetischen Gruppe des integralen Acyl Carrier Proteins mit den verschiedenen aktiven Zentren des Multienzymkomplexes in Kontakt treten. Unter Abspaltung von CO_2 wird aus dem Acetyl- und Malonylrest vom kondensierenden Enzym der Acetoacetylrest gebildet.

Dieser wird von der β -Ketoacylreduktase unter NADPH-Verbrauch zum β -Hydroxybutyrylrest reduziert, der am aktiven Zentrum der Dehydratase zum α, β -ungesättigten Acylrest umgesetzt wird. Eine zweite Reduktion mit NADPH und FMN führt zur Bildung des gesättigten Acylrestes. Nach dem 1. Zyklus wird der Butyrylrest wie am Syntheseanfang der Acetylrest auf die periphere SH-Gruppe übertragen. Die Aufnahme eines zweiten Malonylrestes leitet den nächsten Reaktionszyklus ein. Abgebrochen wird die Synthese bei einer Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen durch die Palmityltransferase, die den Palmityl- bzw. Stearylrest vom ACP auf freies Coenzym A überträgt.

Historisch nahm die Aufklärung der Fettsäurebiosynthese mit Schönheimer (5), Sonderhoff (6), Rittenberg und Bloch (7) ihren Anfang, als erkannt wurde, daß Acetat für die Synthese von Fettsäuren notwendig ist. Die Umkehrung des Fettsäureabbaus, die Bildung des Acetoacetylrestes aus zwei Molekülen Acetyl-CoA erwies sich aus energetischen Gründen als abwegig. Die Funktion des Malonyl-CoA für die Synthese des Acetoacetylrestes wurde zuerst von Lynen auf der Gordon Konferenz in Meriden postuliert (zitiert in 8) und experimentell von Wakil (9) und Brady (10) bewiesen.

Es wurden dann Untersuchungen zur Struktur der Untereinheiten des Enzymkomplexes aus Hefe durchgeführt (4, 11-13). Durch Einfrieren bei -70°C in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen gelang es, den Komplex reversibel in seine Untereinheiten zu zerlegen. Analysen der kleinsten Proteinkomponente ergaben ein Molekulargewicht von 200 000 (14). Aus genetischen Untersuchungen mit Hefe-Fettsäuresynthetasemutanten, die einzelne defekte Teilenzyme besaßen, konnte gefolgert werden, daß der FSS-Komplex aus nur zwei verschiedenen multifunktionellen Polypeptidketten α und β besteht. Die Polypeptidketten werden von zwei voneinander unabhängigen Genloci *fas 2* und *fas 1* codiert. (15)

Nach Schweizer codiert fas 2 für das ACP, die β -Ketoacyl-reduktase und das kondensierende Enzym (α -Kette), fas 1 für die Acetyl-, Malonyl- und die Palmityltransferase, die Dehydratase und die Enoylreduktase (β -Kette). Mit Hilfe der SDS-Elektrophorese konnte das Molekulargewicht der Ketten zu 185 000 (α) und 180 000 (β) bestimmt werden.

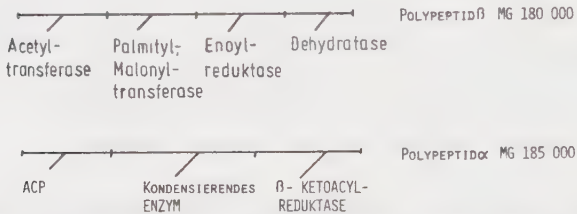


Abb. 2: Genprodukte für Hefe-FSS nach Schweizer (17)

Durch Vergleich der Molekulargewichte der Polypeptidketten α und β mit dem nativen Enzym ergibt sich, daß der Multi-enzymkomplex aus sechs α -Ketten und sechs β -Ketten besteht. Als der Hefe-Komplex durch Acylierung der Lysine mit Dimethylmaleinsäureanhydrid reversibel in seine Untereinheiten dissoziiert werden konnte, war es auch möglich geworden, die α - und β -Untereinheiten über Rohrzuckerdichtezentrifugation zu isolieren (18,19). Durch enzymatische Studien (19) konnte dann in Übereinstimmung mit den genetischen (15-17) und proteinchemischen (34, 6) Untersuchungen die Verteilung der Teilenzyme auf den beiden Polypeptidketten α und β nach Abb. 2 bestätigt werden. Die Malonyl- und die Palmityltransferase erwiesen sich als identische Teilenzyme auf der β -Kette (20,110). Die Reihenfolge der Teilenzyme auf den Proteinketten nach Abb. 2 ist hypothetisch.

1.3. Die dreidimensionale Struktur der Fettsäuresynthetase aus Hefe

Mit Kaninchen-Antikörpern der isolierten α - und β -Ketten konnte Einblick in die Verteilung der Untereinheiten im Gesamtkomplex gewonnen werden.

Native Fettsäuresynthetasmoleküle wurden jeweils mit Antikörpern der α -Kette und der β -Kette vernetzt, und die Dimeren aus einem IgG- und zwei FSS-Molekülen durch Rohrzucker-dichte zentrifugation isoliert (19,21). Im Elektronenmikroskop erscheint native FSS als ein Ellipsoid mit einer langen Achse von 250 Å und einer kurzen Achse mit 200-210 Å, entlang der ein dichter Proteingürtel wie ein Äquator sichtbar wird (22).

Die Bindungsorte der Anti- α -Antikörper lagen auf dem Äquator, die Orte der Anti- β -Antikörper auf der übrigen Fläche des Ellipsoids.

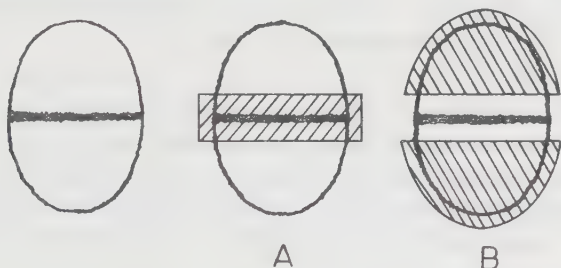


Abb. 3: Schematische Darstellung von nativer FSS im Elektronenmikroskop (negative Anfärbung mit Phosphorwolframsäure) mit schraffierten Flächen als Bindungsorte für Anti- α -Antikörper (A) und für Anti- β -Antikörper (B) nach Wieland (18).

Nach Strukturuntersuchungen an der Fettsäuresynthetase mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung (23) handelt es sich bei dem Hefekomplex um einen ellipsoiden Hohlkörper, der durch eine Wand in 2 Hälften geteilt ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (24) bestätigten das Vorhandensein eines Hohlkörpers mit einer dicht strukturierten Trennwand. Für den ellipsoiden Hohlkörper wurde eine 3,2 Symmetrie vorgeschlagen.

Auf Grund der Übereinstimmung der elektronenmikroskopischen Daten und den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkelstreuungen, sowie der Lokalisierung der Untereinheiten im Elektronenmikroskop mit Antikörpern, wurde ein dreidimensionales Model für die Hefe-Fettsäuresynthetase entwickelt (Abb. 4).

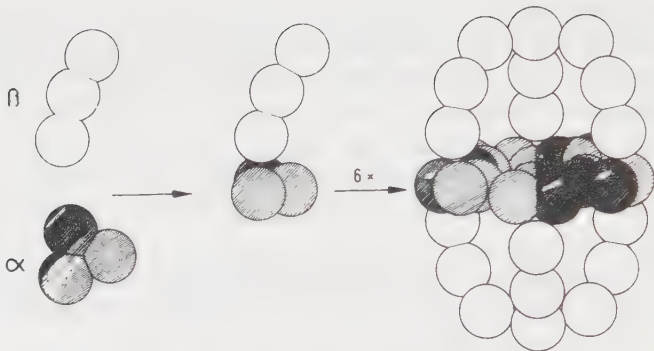


Abb. 4: Modell der Hefe-Fettsäuresynthetase mit $\alpha_6\text{-}\beta_6$ -Struktur (18,21).

Die $\alpha_6\text{-}\beta_6$ -Struktur der Fettsäuresynthetase wird weiter gestützt durch das Vorhandensein von 5,5 - 6 Molekülen FMN (25) als Coenzym der Enoylreduktase (β -Kette), und 5-6 Phosphopantetheinen (26) als prosthetische Gruppe des Acyl Carrier Proteins (α -Kette) pro Enzymmolekül.

1.4. Multifunktionelle Proteine

Multifunktionelle Proteine sind dadurch charakterisiert, daß sie strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, jedoch mehrere katalytische Funktionen besitzen. Arbeiten an zwei Enzymen der Histidin-Biosynthese (27) lieferten Hinweise, daß durch die Fusion nebeneinander liegender Gene, die für die Einzelenzyme kodieren, solche multifunktionellen Proteine entstanden sind. Im Hefe-Enzymkomplex bietet die kovalente Verknüpfung von Einzelenzymen zu multifunktionellen Proteinen den zusätzlichen Vorteil, die stöchiometrische Synthese von ursprünglich 7 Polypeptidketten auf zwei Polypeptidketten zu reduzieren. Wieland (19) konnte zeigen, daß die α -Kette im isolierten Zustand keine enzymatischen Aktivitäten mehr besitzt. Demnach sind die enzymatischen Aktivitäten der α -Ketten auf die Ausbildung von Quartärstrukturen angewiesen. Die funktionellen Bereiche benötigen für ihre katalytischen Aktivitäten den Kontakt anderer Polypeptidketten. Hingegen besitzt

die β -Kette ihre Enzymaktivitäten auch noch im dissoziierten und im isolierten Zustand. Die Bildung von funktionellen Bereichen auf einer multifunktionellen Polypeptidkette kann prinzipiell auf zweierlei Weise verwirklicht werden:

1. Mehrere Domänen der Polypeptidkette bilden eine Funktionseinheit. Die funktionellen Bereiche der Teilenzyme benötigen Kontaktstellen zwischen verschiedenen Teilen der Kette.
2. Benachbarte Abschnitte auf der Primärstruktur der Polypeptidkette bilden unabhängige globuläre Strukturen oder Domänen. Wenn die Teilenzyme der Polypeptidkette β auf einzelnen Domänen verteilt sein sollten, die für sich allein noch enzymatische Aktivität besitzen, dann sollte es möglich sein, durch Einwirkung proteolytischer Enzyme auf die Fettsäuresynthetase zu enzymatisch aktiven Proteinbruchstücken zu kommen. Spaltungsversuche mit Papain (28) unterstützen die Annahme, daß autonome Domänen als Träger der reaktiven Zentren einem proteolytischen Angriff gegenüber resistenter sein könnten, als die exponierten Verbindungsglieder zwischen den einzelnen Domänen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch limitierte Proteolyse die eingangs erwähnte Fragestellung des Zustandekommens funktioneller Bereiche auf einer multifunktionellen Polypeptidkette zu untersuchen. Mit der Gewinnung enzymatisch aktiver Bruchstücke sollte man dann weiteren Einblick in die Struktur dieses Multienzymkomplexes erhalten.

Im Rahmen dieser Untersuchungen war es notwendig geworden, für die Aktivitätsbestimmungen des wasserabspaltenden Teilenzym der Fettsäuresynthetase aus Hefe ein neues Modells substrat zu finden, welches wesentlich schneller dehydratisiert wird als β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin (1) und den hohen Enzymbedarf erheblich erniedrigt. Bisher war es nicht möglich, aus den verdünnten Proteinlösungen die Dehydrataseaktivität zu messen. Der erste Teil der Arbeit befaßt sich deshalb mit der Synthese und der Kinetik verschiedener Modells substrate für die Dehydratase.

2. Modellsubstrate für die Dehydratase der Fettsäuresynthetase aus Hefe

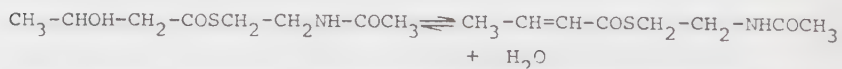
Zur Messung der Teilaktivitäten des Multienzymkomplexes werden Modellsubstrate eingesetzt, und die Reaktion wird durch die chemische Veränderung des Coenzyms oder des Substrates vorzugsweise im "optischen Test" verfolgt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die erforderlichen Mengen an Fettsäuresynthetase für die Standardmessungen der Teilreaktionen. Hier fällt sofort der hohe Bedarf an Fettsäuresynthetase für die Bestimmung der Dehydrataseaktivität auf.

Teilenzym	µg FSS
Acetyltransferase	10
Malonyltransferase	20
1. Reduktion	10
Dehydratase	4000
2. Reduktion (Diaphorasetest)	2
Gesamtaktivität	5

Tabelle 1: Enzymbedarf für die Messung der enzymatischen Aktivitäten im optischen Standardtest

Zur Bestimmung der Aktivität des wasserabspaltenden Teilenzym der Fettsäuresynthetase aus Hefe wurde bisher die Geschwindigkeit gemessen, mit welcher das Enzym das Modellsubstrat D,L-β-Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin dehydratisiert (Gl. 2).

Gl. 2:



Der Verlauf der Reaktion wird mit der Zunahme der Absorption bei $\lambda = 263 \text{ nm}$ (Dehydroacylthioester-Bande (29)) verfolgt Abb. 5.

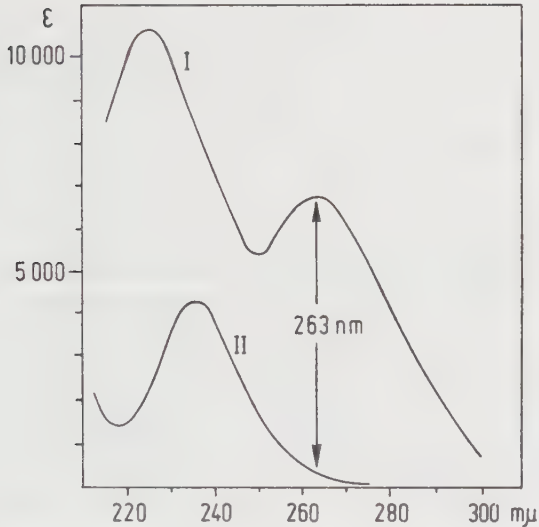


Abb. 5: UV-Spektrum von Crotonyl-N-Acetylcysteamin (I) und D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin (II)

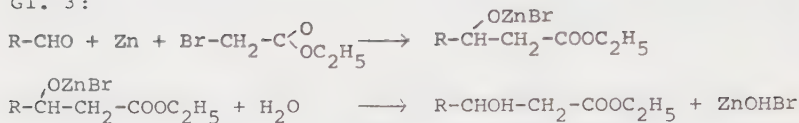
Aufgrund des anfangs erwähnten hohen Enzymbedarfs zur Bestimmung der Dehydrataseaktivität bei 263 nm erschien es sinnvoll, nach einem Modellsubstrat zu suchen, welches von der Fettsäuresynthetase aus Hefe wesentlich schneller dehydratisiert wird. Es wurde sowohl der Einfluß der Kettenlänge der β -Hydroxysäurekomponente des Thioesters als auch der Thiolkomponente auf die Kinetik der enzymatischen Wasserabspaltung untersucht.

2.1. Synthesen der Modellsubstrate

2.1.1. Organisch-präparative Synthesen der D,L- β -Hydroxythioester

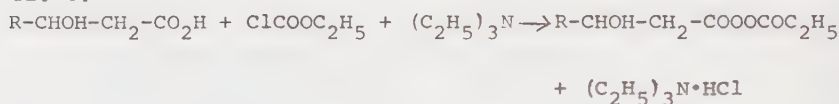
Das Racemat der freien β -Hydroxyfettsäureester erhielt man durch Umsetzung des Aldehydes mit Zink und Bromessigsäure-äthylester (30) (Gl. 3)

Gl. 3:



Die alkalische Verseifung des Esters und anschließendes Ansäuern lieferten die freie Säure als Racemat. Alle Thioester wurden über die gemischten Anhydride der betreffenden freien D,L- β -Hydroxyfettsäuren mit Chlorameisensäureäthylester dargestellt (31). Das gemischte Anhydrid wurde direkt mit dem entsprechenden Thiol umgesetzt (Gl. 4).

Gl. 4:



Als Thiolkomponenten dienten N-Acetylcysteamin und Pantethein. Reinigung der Modellsubstrate: siehe experimenteller Teil

2.1.2. Enzymatische Synthese von D(-)- β -Hydroxybutyryl-S(N-Acetylcysteamin)

S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin, welches ebenfalls über das gemischte Anhydrid synthetisiert wurde, setzte man mit Fettsäuresynthetase um. Die beiden Thioester, Crotonyl-N-Acetylcysteamin als Edukt und D-(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin als Produkt wurden säulenchromatographisch nach (13) getrennt.

2.2. Messung der Dehydrataseaktivität

Das von Ziegenhorn (33) und Weithmann (13) verwendete Meßsystem schließt einen durch nicht enzymatische Dehydratisierung verursachten Blindlauf mittels einer Vier-Küvettenanordnung aus. Da innerhalb einer Stunde bei 25°C in 0,2 M Tris/HCl pH 7,6 das UV-Spektrum des Substrates sich nicht veränderte, wurde mit einer Zwei-Küvettenanordnung gemessen. Es konnte

mit Substrat oder Enzym gestartet werden, die Reihenfolge hatte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Dehydratisierung. Bei den N-Acetylcysteaminthioestern wurde deshalb mit Substrat, bei den Pantetheinderivaten mit Enzym gestartet. Es wurde immer mit der Verbindung gestartet, die eine geringere Absorption bei 263 nm besaß.

Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit wurde nMol Substratumsatz pro Minute (mE) gewählt, bezogen auf ein mg Fettsäuresynthetase. Es wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{263} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gewählt (29).

Die Löslichkeit der längerkettigen Modellsubstrate war schon bei den β -Hydroxyhexanoylthioestern so gering, daß das Substrat als 25 %ige (v/v) Tetrahydrofuranlösung zugegeben wurde. Substrate mit längeren Kettenlängen als die β -Hydroxyhexanoylthioester lagen in einer 50 %igen Tetrahydrofuranlösung vor.

Wie Abbildung 6 zeigt, mußte beachtet werden, daß die Tetrahydrofurankonzentration in der Meßküvette nicht über 1 % (v/v) lag.

Das pH-Wirkungsoptimum der Dehydratase lag zwischen pH 7 und pH 8.5 auf einem Plateau. Das heißt, geringfügige pH-Schwankungen, hervorgerufen durch Enzym- und Substratlösungen konnten bei Standardbedingungen in 0,2 M Tris-HCl pH 7,6 die Aktivität der Dehydratase nicht beeinflussen (Abb. 7).

Im pH-Bereich 6-9 wurde ausschließlich eine enzymatische Dehydratisierung beobachtet.

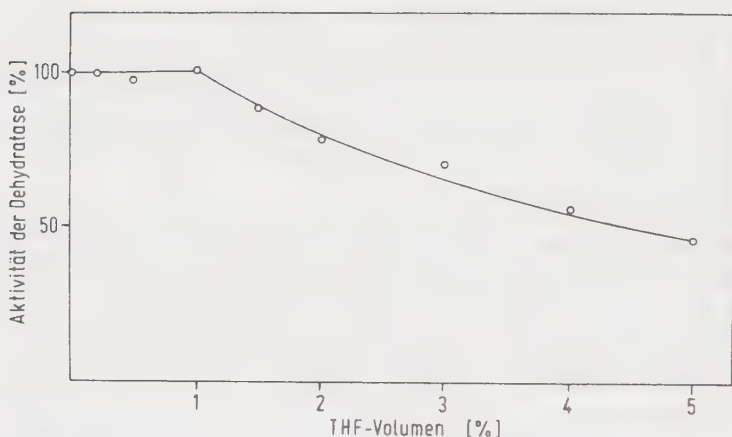


Abb. 6: Dehydrataseaktivität in Abhängigkeit der THF-Konzentration.
Zu 5,87 μg FSS (Gesamtaktivität: 1400 mE/mg) in 0.2 M Tris-HCL pH 7,6 wurden steigende Mengen an THF zupipettiert. Nach zwei Minuten startete man mit 4.6 μMol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein.

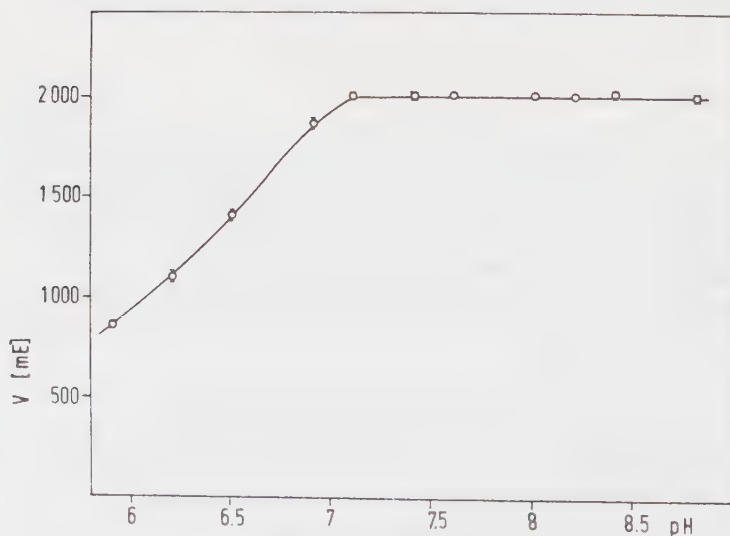


Abb. 7: pH-Wirkungsoptimum der Dehydratase in 0.2 M Tris-HCL Puffer. 200 μl 1 M Tris-HCL pH 5.5 - 9 und 4.6 μMol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein ad 1 ml H_2O . Start mit 5,4 μg FSS (Gesamtaktivität 2800 mE/mg).

2.3. Spezifität der Dehydratase

2.3.1. Stereospezifität

Im Gegensatz zur β -Oxidation (Fettsäureabbau), bei der sowohl das $\text{trans } \Delta^{2,3}\text{-Enoyl-CoA}$ von der Crotonase zum L (+)- β -Hydroxyacyl-CoA wie das $\text{cis } \Delta^{2,3}\text{-Enoyl-CoA}$ zum D (-)- β -Hydroxyacyl-CoA hydratisiert wird, wird bei der Fettsäuresynthese in der Hefe wie in *E. coli* nur der D (-)- β -Hydroxyacylrest zum $\text{trans } \Delta^{2,3}\text{-Enoylrest}$ dehydratisiert (1).

Für das enzymatisch synthetisierte D(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin konnte gezeigt werden, daß es bei gleicher Molarität doppelt so schnell umgesetzt wird, wie das Racematgemisch (Abb. 8).

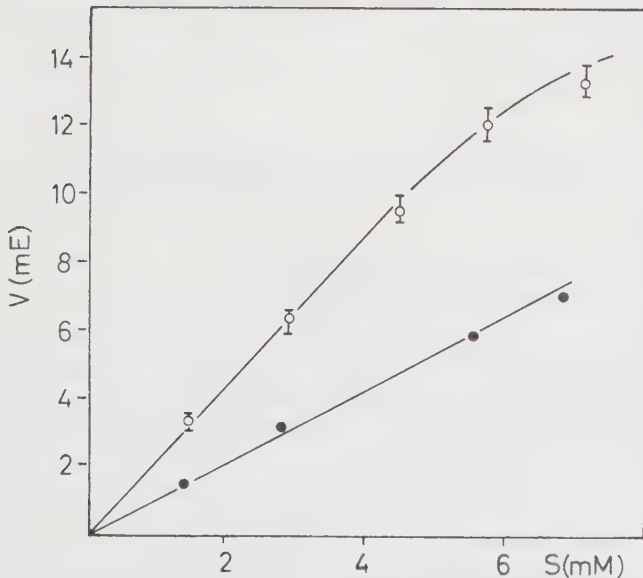


Abb. 8: Substratabhängigkeit der Dehydrataseaktivität mit D-(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin (○—○) und D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin (●—●).

Hieraus folgt, die Dehydratase der Fettsäuresynthetase aus Hefe wird durch das enzymatisch inaktive Enantiomere des Racematgemisches in ihrer Aktivität nicht beeinflusst. Bloch und Mitarbeiter (37) kamen bei der β -Hydroxydecanoyldehydratase aus *E. coli* mit β -Hydroxydecanoyl-N-Acetylcysteamin zum gleichen Ergebnis.

2.3.2. Kettenlängenspezifität

Zur Bestimmung der Kettenlängenspezifität wurden von den Racematen der β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteamine und der β -Hydroxyacyl-Pantetheine die Substratabhängigkeiten der Dehydratase gemessen.

Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der Wasserabspaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration der geradzahligen Hydroxyacylthioester von D,L- β -Hydroxydecanoyl- bis D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin.

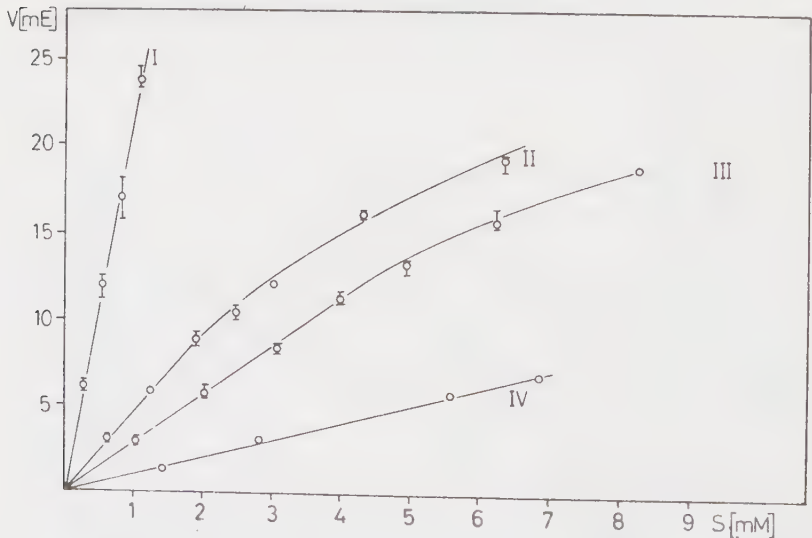


Abb. 9: Dehydrataseaktivität in Abhängigkeit der N-Acetylthioesterkonzentration.

- D,L- β -Hydroxydecanoyl-N-Acetylcysteamin (I)
- D,L- β -Hydroxyoctanoyl-N-Acetylcysteamin (II)
- D,L- β -Hydroxyhexanoyl-N-Acetylcysteamin (III)
- D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin (IV)

Die Substratabhängigkeit von D,L- β -Hydroxydodecanoyl-N-Acetylcysteamin zeigte eine positive Krümmung, obwohl infolge der notwendigen Erhöhung der THF-Konzentration eher eine negative Krümmung zu erwarten war (Abb. 10).

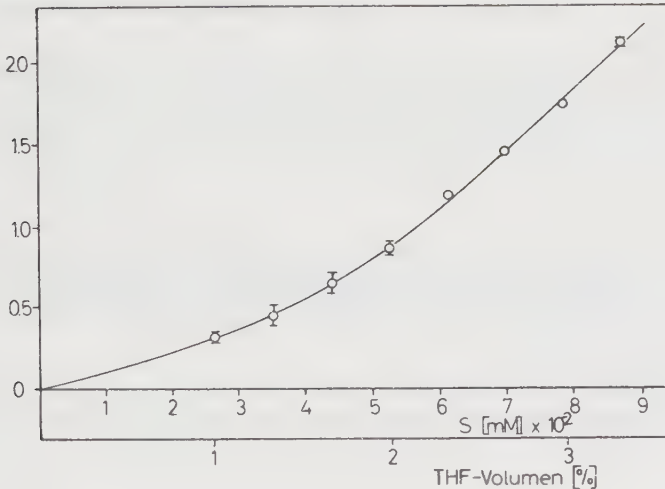


Abb. 10: Michaelis-Menten-Kurve der Dehydratase von D,L- β -Hydroxydodecanoyl-N-Acetylcysteamin

In Tabelle 2 sind die enzymatischen Aktivitäten der Dehydratase in Gegenwart von 0,5 mM D,L- β -Hydroxyacyl-N-Acetylsysteamin verschiedener Kettenlängen zusammengefaßt.

Die Dehydrataseaktivität in Gegenwart von D,L- β -Hydroxydodecanoyl-N-Acetylcysteamin wurde wegen des sigmoiden Verlaufs der Substratabhängigkeit (Abb. 10) in Tabelle 2 nicht berücksichtigt.

Zahl der C-Atome der Säurekomponente	Dehydrataseaktivität mE/mg
4	0,5 (1)
6	1
8	2
10	12

Tab. 2: Dehydrataseaktivität der FSS in Gegenwart von 0,5 mM D,L- β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteamin verschiedener Kettenlängen. In Klammern: Dehydrataseaktivität von D (-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin. Meßbedingungen siehe exp. Teil.

In Abb. 11 ist die Abhängigkeit der enzymatischen Wasserabspaltungsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der D,L- β -Hydroxyacylpantetheinthioester vom Dodecanoyl- bis zum Butyryl-derivat aufgetragen.

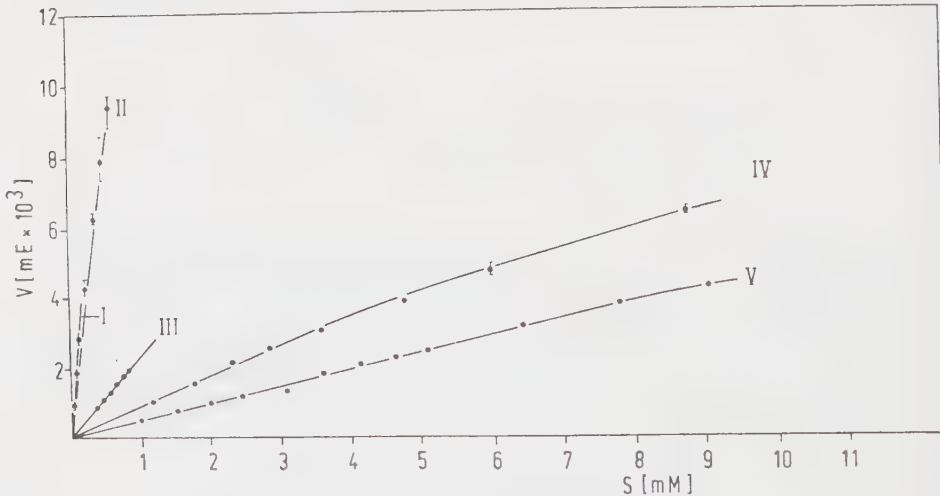


Abb. 11: Michaelis-Menten-Kurve der Dehydratase
D,L- β -Hydroxydodecanoylpantethein (I)
D,L- β -Hydroxydecanoylpantethein (II)
D,L- β -Hydroxyoctanoylpantethein (III)
D,L- β -Hydroxyhexanoylpantethein (IV)
D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein (V)

In Tabelle 3 sind die enzymatischen Aktivitäten der Dehydratase in Gegenwart von 0,5 mM D,L- β -Hydroxyacylpantethein verschiedener Kettenlängen zusammengefaßt.

Zahl der C-Atome der Säurekomponente	Dehydrataseaktivität mE/mg
4	250
6	500
8	1000
10	7500
12	11000

Tab. 3: Dehydrataseaktivität der FSS in Gegenwart von 0,5 mM D,L- β -Hydroxyacylpantethein verschiedener Kettenlängen. Meßbedingungen siehe exp. Teil.

Nach Tabelle 2 und 3 nimmt die Dehydraseaktivität mit zunehmender Kettenlänge der Säurekomponente des Modellsubstrates deutlich zu.

Eine Sättigungskurve konnte auf Grund der geringen Löslichkeit der Modellsubstrate nicht aufgenommen werden. Aus diesem Grund war eine Auswertung der Meßergebnisse von Abb. 10 und 11 nach Lineweaver-Burk nicht möglich.

2.3.3. Spezifität der Thiolkomponente

Ziegenhorn konnte durch Messung der Dehydrataseaktivität mit β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin nach vorheriger Behandlung der Fettsäuresynthetase mit N-Äthylmaleinimid und Iodacetamid zeigen, daß der β -Hydroxybutyrylrest nur am Modellsubstrat dehydratisiert wird und nicht am Acyl Carrier Protein (33).

Versuche mit Malonyl-CoA und β -Hydroxydecanoyl-CoA als Starter für die Gesamtfettsäurebiosynthese zeigten, daß die Acetyltransferase den β -Hydroxydecanoylrest unter den Bedingungen der Dehydratasemessung nicht auf die zentrale SH-Gruppe übertragen kann (35).

Aus diesem Grunde sollte sich die Thiolkomponente des Modellsubstrates auf die Enzymaktivität am günstigsten auswirken, die der prosthetischen Gruppe des Acyl Carrier Proteins des Hefe-enzymes am ähnlichsten ist (Abb. 12).

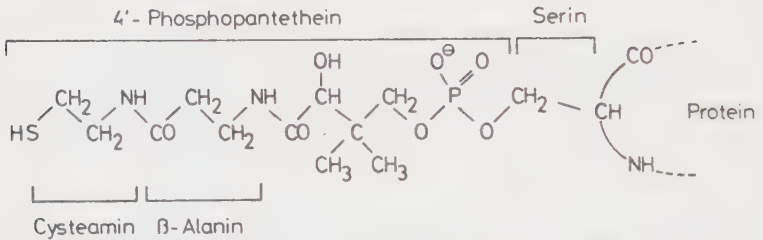


Abb. 12: Struktur des 4'-Phosphopantethein der prosthetischen Gruppe des integrierten "acyl carrier proteins".

Tatsächlich erhöhen sich die Dehydrataseaktivitäten mit Modellsubstraten gleicher Kettenlänge bei Ersatz von N-Acetylcysteamin durch Pantethein um das 500-fache (Tab. 2 und 3).

2.4. Stabilität des dehydratisierenden Enzyms

Oesterhelt (36) und Ziegenhorn (33) konnten zeigen, daß mit Ausnahme des kondensierenden Enzyms die Teilenzyme beim Übergang zu niedrigeren Gesamtaktivitäten weitgehend aktiv bleiben.

Mit Ausnahme des kondensierenden Enzyms ergab sich keine Korrelation zwischen spezifischer Aktivität der Teilenzyme und der spezifischen Gesamtaktivität.

Bei der Malonyltransferase, der Palmityltransferase, der Enoylreduktase und der Dehydratase ergaben sich bei den Enzympräparationen verschiedener Anreicherungen im wesentlichen immer annähernd die gleichen spezifischen Aktivitäten.

Das Dehydrataseenzym zeigte eine hohe Stabilität, in dem die Dehydrataseaktivität im Gegensatz zur enzymatischen Aktivität der Gesamtsynthese bei 25 °C über 3 Tage nicht abnahm (Abb. 12).

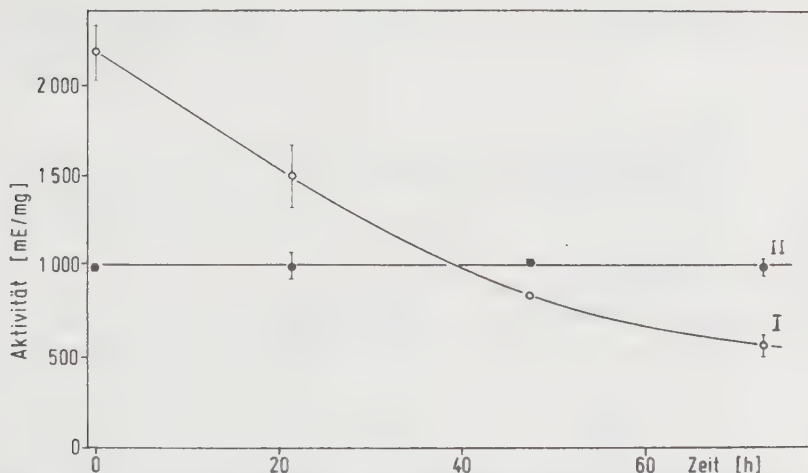


Abb. 12: Stabilität der enzymatischen Aktivitäten von Gesamt-synthese und Dehydratase bei Raumtemperatur (25°C). Proteinkonzentration: 0,696 mg FSS/ml. Puffer: 0,1 M KPO_4 pH 6,5 0,02 % NaN_3 (w/w). Für die enzymatischen Tests wurden jeweils 10 μ l entnommen. Gesamtaktivität (I) im Substratsättigungsbereich. Dehydrataseaktivität (II) mit 0,36 μ Mol D,L- β -Hydroxydecanoylpantethein.

2.5. Kontrollexperimente zur Messung der Dehydrataseaktivität

Für die Richtigkeit der Messungen der Dehydrataseteilaktivität bei 263 nm sprechen folgende Befunde:

- die totale Extinktionsänderung zeigte bei den Racematgemischen von β -Hydroxybutyrylpantethein, β -Hydroxyoctanoylpantethein und β -Hydroxydecanoylpantethein das erwartete Mengenverhältnis von D(-)- β -Hydroxyacylpantethein zu Enyolpantethein (Tabelle 5):

Modellsubstrat	Enzym	Konzentrationsverhältnis D(-)- β -Hydroxyacyl : Enoylthioester
D, L- β -Hydroxybutyrylpantethein	FSS aus Hefe	3.25 : 1
D, L- β -Hydroxyoctanoylpantethein	FSS aus Hefe	3.6 : 1
D, L- β -Hydroxydecanoylpantethein	FSS aus Hefe	2.74 : 1
D, L- β -Hydroxydecanoyl N-Acetylcysteamin	β -Hydroxydecanoyldehydratase aus E.coli-FSS	2.85 : 1 (37)
L(+)- β -Hydroxybutyryl - CoA	Crotonase	3.45 : 1 (38)

Tab. 4 : Messung des chemischen Gleichgewichts der Dehydratase durch Endwertbestimmung bei 263nm.

- b) Bei allen Messungen fand man eine lineare Abhängigkeit der Dehydrataseaktivität von der eingesetzten Enzymmenge.
- c) Es konnte keine Substrathemmung festgestellt werden, das Nachstarten mit Substrat nach Einstellung des chemischen Gleichgewichts zeigte die erwartete Extinktionsänderung.
- d) Bei keiner Messung des Substrats gegen Puffer unter Testbedingungen wurde ein Blindlauf beobachtet, es fand keine unspezifische Dehydratisierung bei Zugabe von Serumalbumin statt.

2.6. Weitere Methoden zur Messung der Dehydrataseaktivität

Porter und Mitarbeiter (39) führten die Messung der Dehydratase bei Konzentrationen von β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin über 5mM bei 270nm durch, um die Grundabsorption des β -Hydroxyacylthioesters zu verringern; mit β -Hydroxyacyl-CoenzymA-Verbindungen wurde bei 280nm gemessen (40). Bei den hier durchgeführten Messungen lag die Löslichkeitsgrenze der am leichtesten löslichen Butyrylderivate bei

9 mM. Bei höheren Konzentrationen traten in der Küvette Trübungen auf.

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivitätsbestimmung des hier besprochenen Teilenzymys liegt in der Messung der Hydrataseaktivität bei 263 nm.

Weil die Löslichkeit des $\text{trans}\Delta^{2,3}$ - enoyl-Thioesters beträchtlich unter der des β -Hydroxyacylthioesters liegt, wurde auch von dieser Meßmethode abgesehen.

2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Spezifität der Dehydratase bezüglich der Thiolkomponente des Thioesters macht sich beim Ersatz von N-Acetylcysteamin durch Pantethein in einer Geschwindigkeitserhöhung der enzymatischen Wasserabspaltung um den Faktor 5×10^2 bemerkbar.

Die Kettenlängenspezifität drückt sich in einer Verdoppelung bis Versiebenfachung der Dehydrataseaktivität pro Verlängerung der Säurekomponente des Thioesters um zwei C-Atome aus. Wie die β -Hydroxydecanoyl-ACP-Dehydratase aus *E. coli* (43-45) ist die Dehydratase der Hefe-Fettsäuresynthetase ein Enzym mit hoher Stabilität, einem breiten pH-Wirkungsoptimum und strenger Stereospezifität. Das enzymatisch inaktive L(+)-Enantiomere hemmt bei beiden Enzymen die Dehydratisierung des aktiven D(-)-Enantiomeren nicht. Am Hefeenzym wurde die Dehydratisierung des D(-)-Antipoden von Sedgwick (40) als cis-Elimination gedeutet.

Für das Hefeenzym konnte mit Hilfe der Pantetheinderivate gezeigt werden, daß die spezifische Aktivität bezüglich der Dehydratisierung schon unterhalb der Substratsättigung wesentlich höher ist, als die spezifische Aktivität der Gesamtreaktion im Substratsättigungsbereich (Abb. 11).

Für die Messung der Dehydratase der Fettsäuresynthetase aus Hefe empfiehlt sich als schneller und einfacher Test die optische Messung bei 263 nm in Gegenwart von 5 mM D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein. Dieser Thioester ist von den Pantetheinderivaten am leichtesten löslich, und die Hydroxybuttersäure ist im Gegensatz zu allen anderen β -Hydroxysäuren als Ausgangssubstanz für die organische Synthese käuflich erhältlich.

Durch Vereinfachung des bisherigen Testsystems (33) auf ein Zweiküvetten-System und der Verwendung des neuen Modellsubstrates erniedrigt sich der Enzymbedarf für den Dehydratase-Test am Hefeenzym um das 1000-fache.

Durch Aktivitätsmessungen mit den Pantetheinderivaten konnte das Dehydrataseenzym auf der β -Kette der Hefefettsäuresynthetase lokalisiert werden (18). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Porter et al. (39), stimmt aber mit den genetischen Untersuchungen von Schweizer (15) überein.

3. Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase aus Hefe

Da die Fettsäuresynthetase aus Hefe aus nur zwei verschiedenen multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaut ist, können einzelne Teilenzyme aus dem Komplex nur durch vorhergehende Spaltung von Peptidbindungen isoliert werden. Durch Hydrolyse der Peptidbindung mittels Proteasen sollte es möglich sein, intakte globuläre Bruchstücke oder Domänen zu isolieren.

Erste Versuche mit Papain von Hagen (47) und später von Hess (28) bekräftigten diese Annahme.

Bei den von Hess isolierten Spaltstücken mit Molekulargewichten von ca. 160 000 Dalton handelte es sich um die geringfügig verkürzte β -Kette, die α -Kette schien dem proteolytischen Angriff gegenüber wesentlich labiler zu sein.

Die Geschwindigkeit der proteolytischen Spaltung für eine gegebene Peptidbindung hängt im wesentlichen von zwei Faktoren ab.

1) Die Spezifität der Protease:

Die Geschwindigkeit wird beeinflusst durch die Anzahl der spezifisch spaltbaren Peptidbindungen und im geringen Ausmaß durch die benachbarten Aminosäuren der zu spaltenden Bindung.

2) Die Zugänglichkeit der Peptidbindung für die Protease:

Hier beeinflusst die Struktur des Substratproteins die Selektivität der Protease.

Unter der in der Einleitung erwähnten Annahme, daß die aktiven Zentren der Teilenzyme auf einzelnen Domänen der multifunktionellen Polypeptidkette untergebracht sind, sollte die Gewinnung enzymatisch aktiver Bruchstücke durch einen proteolytischen Angriff auf die Verbindungsglieder zwischen den einzelnen globulären Struktureinheiten ermöglicht werden (Abb. 13).

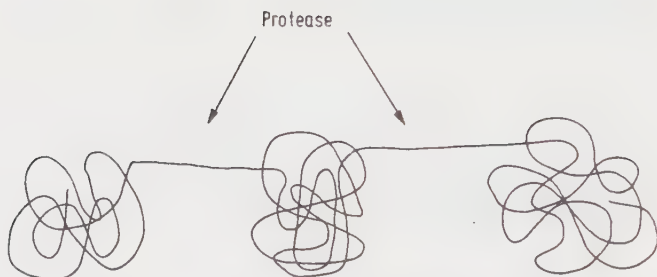


Abb. 13: Idealisiertes, hypothetisches Modell eines proteolytischen Angriffs auf eine multifunktionelle Polypeptidkette zur Gewinnung enzymatisch aktiver Bruchstücke

3.1. Vorversuche zur Anreicherung von enzymatisch aktiven Bruchstücken der Polypeptidketten α und β .

Fettsäuresynthetase wurde mit verschiedenen Proteasen inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen wurde die Proteolyse in entnommenen Aliquoten aus dem Inkubationsansatz gehemmt. Anschließend wurden die Teilaktivitäten der α -Kette (β -Ketoacylreduktase) und der β -Kette (Acetyl- und Malonyltransferase, Dehydratase und Enoylreduktase) sowie die Aktivität der Gesamtsynthese gemessen. Alle Proben wurden auch einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen. So konnte die Kinetik der Proteolyse anhand der verschwindenden bzw. neu auftretenden Proteinbanden und der unterschiedlichen Inaktivierung der Teilenzyme verfolgt werden.

Es zeigte sich bei allen Versuchen, daß die Enzyme der α -Kette wesentlich schneller inaktiviert wurden, als die der β -Kette. Ziel der Vorversuche war es, eine Protease zu finden, bei der

- 1) möglichst nur eine Teilaktivität nicht oder wenig geschädigt wird.
- 2) das Produkt der Proteolyse möglichst wenig Proteinbanden auf dem SDS-Polyacrylamidgel ergibt.

3) Bruchstücke mit niedrigem Molekulargewicht auftreten.

Aufgrund der schnellen Inaktivierung der Teilenzyme der α -Kette nach den verschiedenen limitierten Proteolysen beschränkte sich unser Interesse auf Bruchstücke der β -Kette.

Unter der Annahme, daß die vier Teilenzyme der β -Kette (MG: 18×10^4) auf Domänen mit Molekulargewichten gleicher Größenordnung verteilt sind, galt unser Interesse Bruchstücken mit Molekulargewichten unter 9×10^4 Dalton.

3.1.1. Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase mit spezifischen Proteasen.

Fettsäuresynthetase wurde mit folgenden spezifischen Proteasen behandelt:

- 1) Clostripain (*Clostridium histolyticum* Protease B) (49) spaltet spezifisch am Carboxylende von Arginin.
- 2) Die Protease aus der Unterkieferdrüse der Maus (50) spaltet spezifisch am Carboxylende von Arginin.
- 3) Protease aus *Staphylococcus aureus* (51, 52) spaltet spezifisch am Carboxylende der Glutaminsäure.
- 4) Trypsin vom Rind (53) spaltet spezifisch am Carboxylende von Arginin und Lysin.

In Abb. 14 und Abb. 15 ist die Kinetik der Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch Clostripain und durch die Protease aus *Staphylococcus aureus* abgebildet.

3.1.2. Limitierte Proteolyse der Fettsäuresynthetase mit unspezifischen Proteasen.

Die Fettsäuresynthetase wurde mit folgenden unspezifischen Proteasen behandelt:

- 1) Elastase aus Schweinepankreas (54) spaltet am Carboxylende von Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Glycin und Serin.
- 2) Ficin aus Feigenbaum-Latex (53) spaltet Peptide und Ester vorzugsweise an aromatischen Aminosäuren.
- 3) Papain aus *Papaya carica* (53) spaltet die meisten Peptidbindungen, Ester- und Thioesterbindungen.

4) Pronase, nicht spezifische Protease aus *Streptomyces griseus* (55).

5) Proteinase K aus *Tritirachum album* Limber (56) hydrolysiert native und denaturierte Proteine.

6) Subtilisin (Subtilopeptidase A) aus *Bacillus subtilis* (53) spaltet Peptidbindungen und Esterbindungen.

7) Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus* (57) spaltet Peptidbindungen, an denen stark hydrophobe Aminosäuren beteiligt sind.

8) α -Chymotrypsin aus Rinder-Pankreas (58) spaltet am Carboxylende aromatischer und stark hydrophober Aminosäuren.

In Abb. 16 und Abb. 17 ist die Inaktivierung der Fettsäuresynthetase aus Hefe durch Thermolysin und durch Elastase abgebildet.

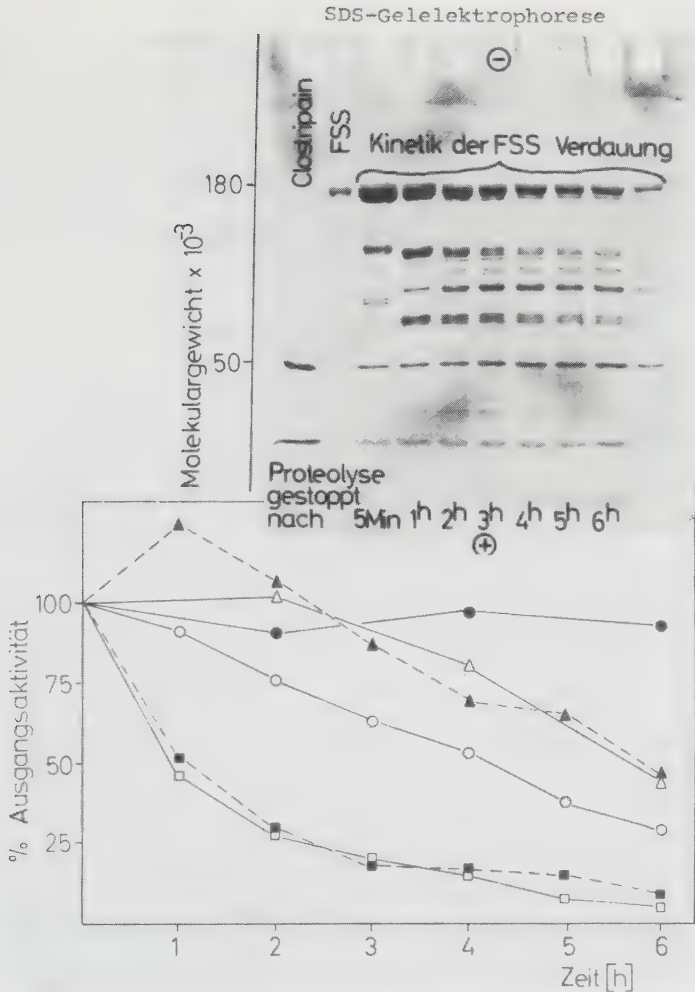


Abb. 14: Kinetik der Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch Clostripain:

6,67 mg FSS in 0,2 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 25^{mM} CaCl₂ wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,95 mg Clostripain bei 25° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 25 μ l entnommen und mit eiskaltem 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 0,3 M K-EDTA 3-fach verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden die einzelnen Teilaktivitäten bestimmt. Anschließend wurden die Proben eingefroren.

- : Gesamtaktivität
- : β -Ketoacylreduktase
- : Malonyltransferase

- : Gesamtaktivität mit Clostripain und EDTA (Inhibitor)
- △—△ : Dehydratase
- ▲---▲ : Acetyltransferase

Später wurden die Proben (ca. 35-50 μ g) auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

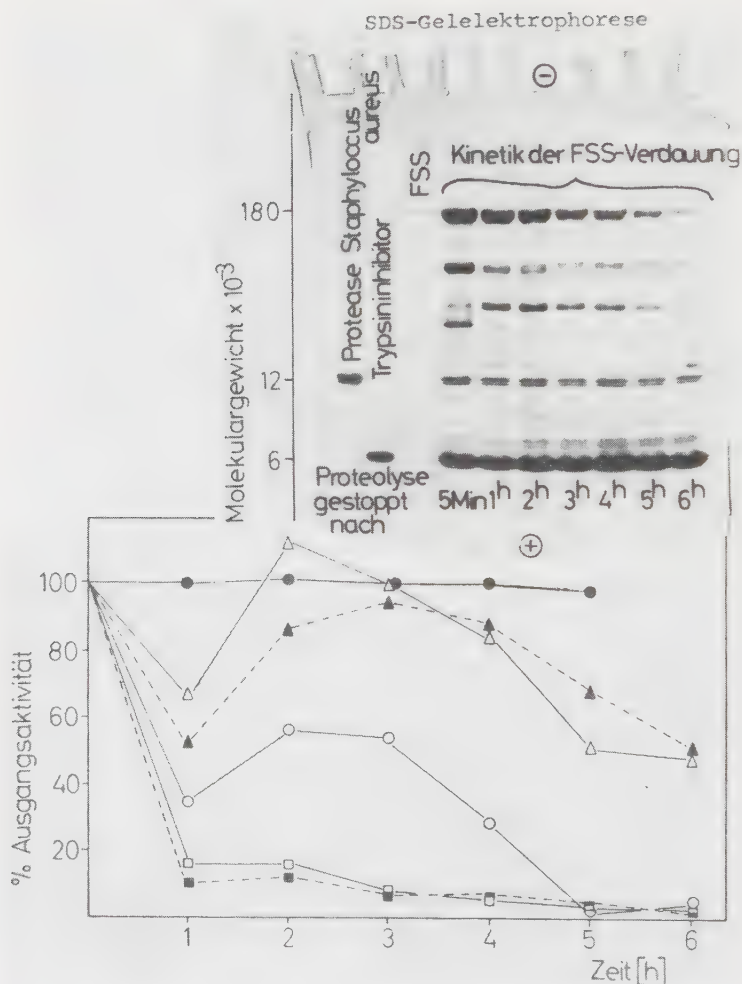


Abb. 15: Kinetik der Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch die Protease aus *Staphylococcus aureus*. 7,06 mg FSS in 0,3 ml 0,1 M KPO_4 pH 7,5 wurden bei 25°C zum Zeitpunkt 0 mit 1 mg Protease aus *S. aureus* inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 40 μl entnommen und mit eiskaltem 0,1 M KPO_4 pH 7,5 Puffer und 0,3 mg Trypsininhibitor aus Rinder-Pankreas 2,5-fach verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden die einzelnen Teilaktivitäten bestimmt.

- | | |
|-----------------------------------|--|
| □—□: Gesamtaktivität | ●—●: Gesamtaktivität mit Protease und Trypsininhibitor |
| ■---■: β -Ketoacylreduktase | △—△: Dehydratase |
| ○—○: Malonyltransferase | ▲---▲: Acetyltransferase |

Später wurden die Proben (ca. 35–50 μg) auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

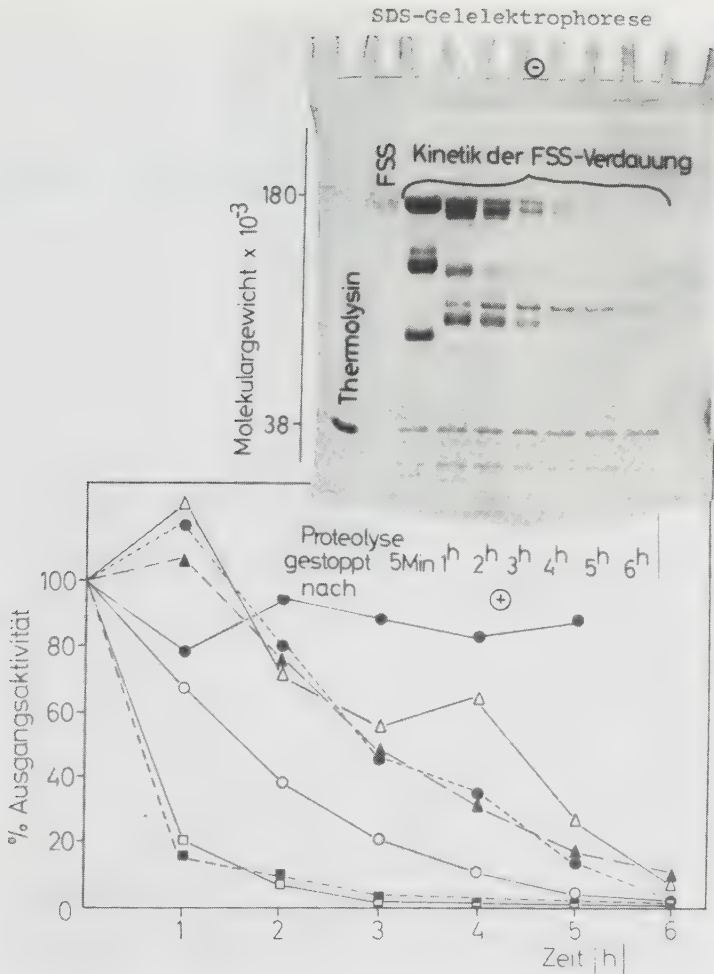


Abb. 16: Kinetik der Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch Thermolysin:

8 mg FSS in 0,3 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5, 1,7 mM CaCl_2 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,43 mg Thermolysin inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 40 μl entnommen und mit eiskaltem 0,1 M KPO_4 pH 6,5 Puffer 0,1 M K-EDTA 2,5-fach verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden die Teilaktivitäten gemessen. Anschließend wurden die Proben eingefroren.

- : Gesamtaktivität ●—●: Gesamtaktivität mit Protease und K-EDTA (Inhibitor)
- : β-Ketoacylreduktase △—△: Dehydratase
- : Malonyltransferase ▲--▲: Acetyltransferase
- : Enoylreduktase

Später wurden die Proben (ca. 35–50 μg) auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

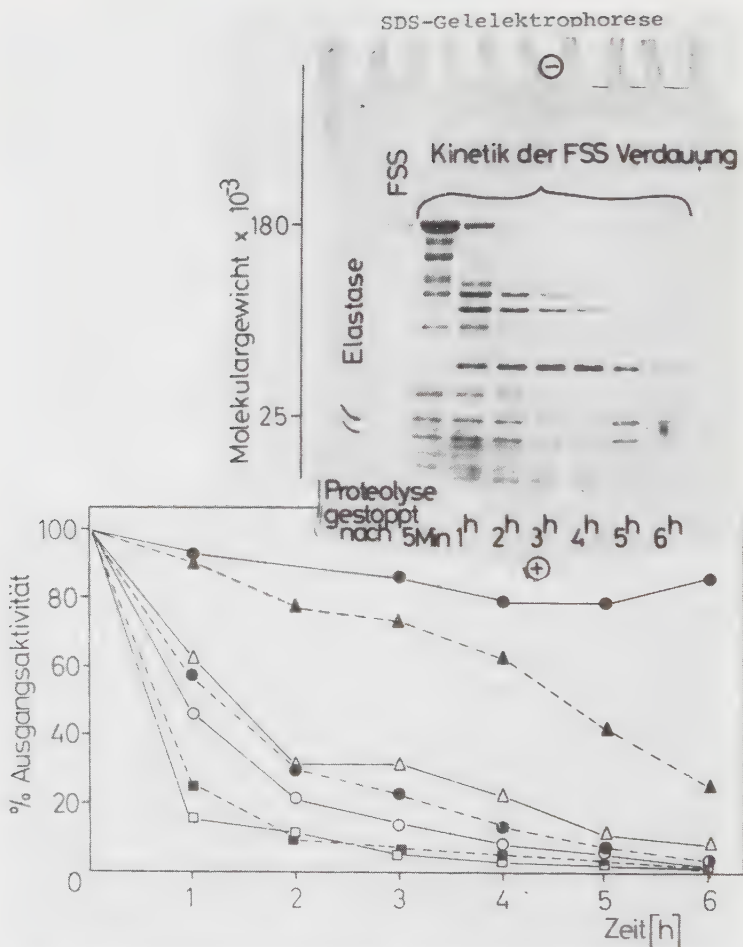


Abb. 17: Kinetik der Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch Elastase:

7,36 mg FSS in 0,3 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,4 mg Elastase inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 40 μ l entnommen und mit eiskaltem 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 2,5-fach verdünnt und 10 μ l einer PMSF-Lösung (70 mg/ml Aceton) zugegeben. Aus diesen Verdünnungen wurden die Teilaktivitäten gemessen. Anschließend wurden die Proben eingefroren.

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| □—□: Gesamtaktivität | ●—●: Gesamtaktivität mit Pro- |
| ■---■: β -Ketoacylreduktase | tease und PMSF (Inhibitor) |
| ○—○: Malonyltransferase | △—△: Dehydratase |
| ●---●: Enoylreduktase | ▲---▲: Acetyltransferase |

Später wurden die Proben (ca. 35-50 μ g) auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

3.2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Anhand der Anzahl von Proteinbanden auf den SDS-Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophoresen konnte entschieden werden, ob es hoffnungsvoll schien, ein einzelnes Polypeptid isolieren zu können. In Tabelle 5 sind die geeignetsten Proteasen für die Anreicherung eines Teilenzym zusammengefaßt.

Protease	Spaltpuffer	stabilste Teilaktivitäten der Hefe-FSS nach Proteolyse
Clostripain	0,1 M Tris/HCl pH 7,5	Dehydratase und Acetyltransferase (Abb. 14)
Elastase	0,1 M Tris/HCl pH 8,2	Acetyltransferase (Abb. 17)
Protease aus <i>S. aureus</i>	0,1 M KPO ₄ pH 7,5	Acetyltransferase Dehydratase und Enoylreduktase (Abb. 15)
Thermolysin	0,1 M Tris/HCl pH 7,5	Dehydratase (Abb. 16)
Trypsin	0,6 M Tris/HCl pH 7,5 25 % Glycerin	Dehydratase
Subtilisin	0,1 M KPO ₄ pH 7,5 30 % Glycérin	Acetyltransferase

Tab. 5: Inaktivierungsspezifität der Proteasen, gegenüber den Teilenzymen der Fettsäuresynthetase.
Es wurden nur die Proteasen zusammengefaßt, die nach der SDS-Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese eine begrenzte Anzahl von Proteinbanden lieferten.

Für die Isolierung eines enzymatisch aktiven Fragments mit nur einer Teilaktivität schien die Elastase-Verdauung am geeignetsten:

- 1) Der Elastase-Spaltansatz enthielt nur wenige Bruchstücke mit Molekulargewichten um 5×10^4 Dalton.
- 2) Die Elastase erwies sich als die selektivste Protease: Alle anderen Teilaktivitäten, außer der Acetyltransferase, wurden schnell geschädigt.

4. Isolierung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente aus Fettsäuresynthetase nach limitierter Proteolyse

4.1. Hydrolyse der Fettsäuresynthetase aus Hefe mit Elastase.

Für die Anreicherung enzymatisch aktiver Polypeptidfragmente wurden die Versuchsbedingungen wie Temperatur, Konzentrationsverhältnis von Fettsäuresynthetase zu Elastase und die Konzentrationen der Proteinlösungen konstant gehalten, um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Die Proteolyse wurde zu dem Zeitpunkt gestoppt, an dem die Aktivität der Gesamtsynthese der Fettsäuresynthetase während der Elastaseverdauung unter 10 % gefallen war (Abb. 18).

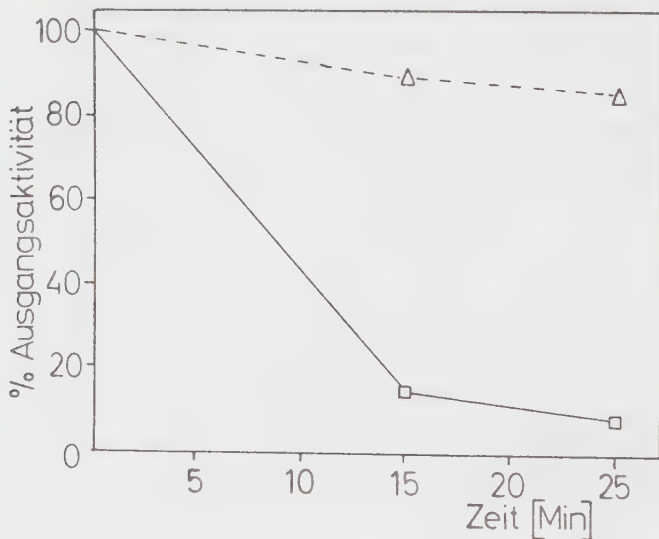


Abb. 18: Einfluß der Hydrolyse der Fettsäuresynthetase mit Elastase auf die Inaktivierung der Gesamtaktivität ($\square-\square-\square$) und der Acetyltransferaseaktivität ($\triangle-\triangle-\triangle$). 1,335 g FSS in 10,8 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,2 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 89 mg Elastase bei 25°C inkubiert. Die Hydrolyse des Enzyms wurde durch Messung der Gesamtaktivität und der Acetyltransferaseaktivität verfolgt. Nachdem die Gesamtaktivität unter 10 % der Ausgangsaktivität gefallen war, wurde die Proteolyse sofort mit 200 µl einer PMSF-Lösung (70 mg PMSF/1 ml Aceton) gestoppt.

4.2. Anreicherung der Acetyltransferase- und der Dehydratase-Komponente

4.2.1. Entfernung ungespaltener Fettsäuresynthetase durch Ultrazentrifugation.

Der Inkubationsansatz der limitierten Elastasespaltung wurde 3 1/2 - 4 Stunden bei 45 000 rpm einer Ultrazentrifugation unterworfen, wobei der intakte Multienzymkomplex und unlösliches Protein vollständig sedimentierten.

4.2.2. Auftrennung des Elastase-Spaltgemisches durch Gelfiltration.

Ultragelschritt 1

Der Überstand des Spaltansatzes wurde nach der Ultrazentrifugation mit Glycerin versetzt (20 % v/v) und an einer Gelfiltrationssäule (Ultragel Ac A 44: Fraktionierungsbereich 10 000 - 130 000 Dalton bezogen auf globuläre Proteine) chromatographiert. Das Elutionsdiagramm der Gelfiltration (Abb. 19) zeigt bei dem dritten Proteingipfel (III) die höchste spezifische Acetyltransferaseaktivität. Die Fraktionen der Proteingipfel von I, II, III und IV wurden jeweils vereinigt, mit Ammonsulfat gefällt und zentrifugiert. Die in wenig Puffer aufgenommenen Niederschläge wurden dialysiert. Die Dialysate der isolierten Proteingipfel wurden anschließend auf einem SDS-Polyacrylamid-Plattengel elektrophoretisiert (Abb. 19 rechts oben). Die Untersuchung der Proteingipfel I und II wird in Abschnitt 6.2. behandelt. Der Proteingipfel III enthielt folgende enzymatische Teilaktivitäten:

- 1) Acetyltransferase, spezifische Aktivität: 400 % *
- 2) Dehydratase, spezifische Aktivität: 140 %
- 3) Malonyltransferase: 31 %

Ultragelschritt 2

Das Dialysat des Proteingipfels III (Ultragelschritt 1) wurde rechromatographiert (Abb. 20). In Proteingipfel II verblieben nach Ammoniumsulfatfällung und anschließender Dialyse 552 % Acetyltransferase-, 112 % Dehydratase- und 8 % Malonyltransferaseaktivität*.

* Die spezifischen Aktivitäten in % beziehen sich auf die Ausgangsaktivitäten nativer PSS.

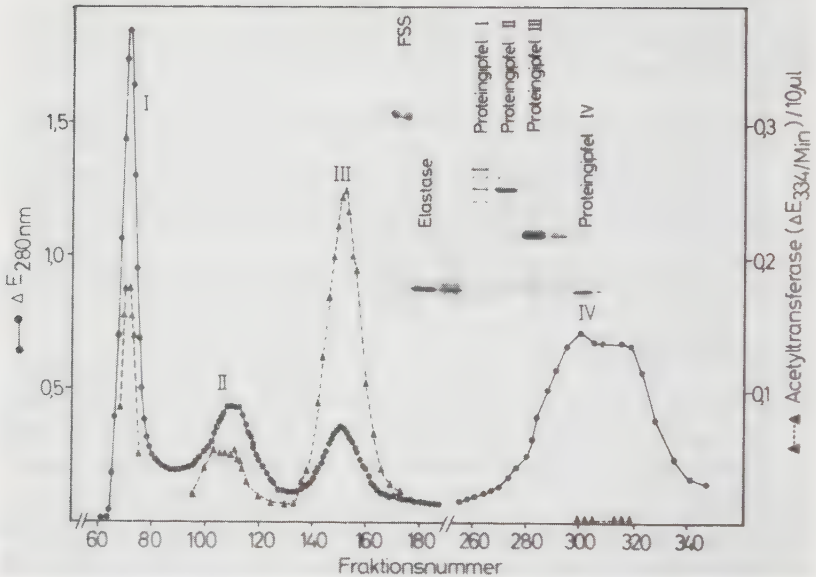


Abb. 19: Ultragel Aca 44-Gelfiltration des Elastase-Spaltgemisches nach Ultrazentrifugation. Der Überstand der Zentrifugation (4.2.1) wurde auf die Säule aufgetragen. Säule: 8 cm ϕ , Gelbetheöhe: 82 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,2. Probenvolumen: 20 ml 0,1 M Tris/HCl 20 % Glycerin, Durchfluß: 2,3 ml/Min, Fraktionsvolumen: 9,2 ml, Temperatur: 4° C. FSS, Elastase und die Proteingipfel I, II, III und IV (je 13 μ g) wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (5-15 % Acrylamid) elektrophoretisiert.

Die Doppelbande des Proteingipfels II im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 20) ließ sich unter nicht denaturierenden Bedingungen mit folgenden Methoden nicht auftrennen:

- 1) Präparative Gelelektrophorese nach Weithmann (13)
- 2) DEAE-Ionenaustauscherchromatographie
- 3) Hydrophobe Chromatographie an AH-Sepharose 4B
- 4) Kovalente Chromatographie an aktivierter Thiol-Sepharose
- 5) Fraktionierte Ammoniumsulfat- bzw. Polyäthylenglykolfällung.

Eine Reinigung des Proteingipfels II unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff oder SDS kam nicht in Frage, da sich die enzymatischen Aktivitäten des denaturierten Proteins nicht reaktivieren ließen.

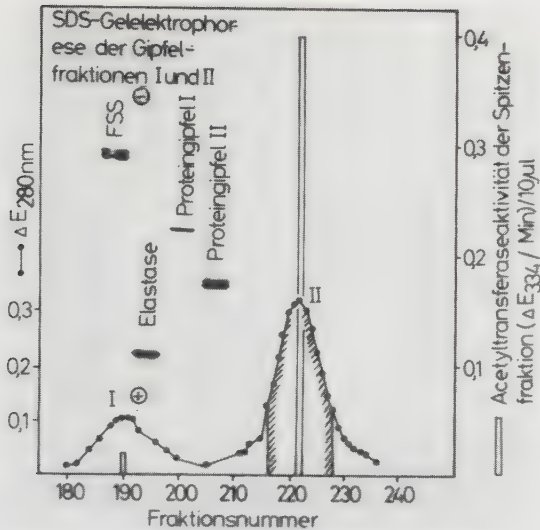


Abb. 20: Rechromatographie des dritten Proteingipfels (Abb. 19).

Säule: 6 cm Ø, Gelbetthöhe: 141 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,2, Probenvolumen: 11,2 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 20 % Glycerin, Proteinmenge: 94 mg, Durchfluß: 1,3 ml/Min, Fraktionsvolumen: 9,1 ml, Temperatur: 4°C. Fettsäuresynthetase, Elastase und die Proteingipfel I und II (10 µg - 13 µg) wurden jeweils auf eine SDS-Polyacrylamid-Platten-gel-Elektrophorese aufgetragen.

Die Auftrennung der Proteindoppelbande in eine Acetyltransferasekomponente (ATC) und eine Dehydratasekomponente (DHC) gelang schließlich durch Chromatographie an Hydroxylapatit.

4.2.3. Auftrennung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente durch Chromatographie an Hydroxylapatit.

Die vereinigten Fraktionen des Proteingipfels II nach Rechromatographie (Abb. 20) wurden mit Ammoniumsulfat gefällt und zentrifugiert. Der in wenig Puffer aufgenommene Niederschlag wurde gegen 20 mM K-Phosphat-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde dann an Hydroxylapatit mit Stufengradienten chromatographiert (Abb. 21). Die Proteingipfel Ia und Ib konnten mit der Anfangsmolarität (0,02 M K-Phosphat) eluiert werden. Die einzelnen Stufen des Konzentrationsgradienten wurden über einen linearen Konzentrationsgradienten ermittelt, in dem durch Leitfähigkeitsmessungen die Molarität an den Aktivitätsgipfeln der Acetyltransferase und der Dehydratase ermittelt werden konnte.

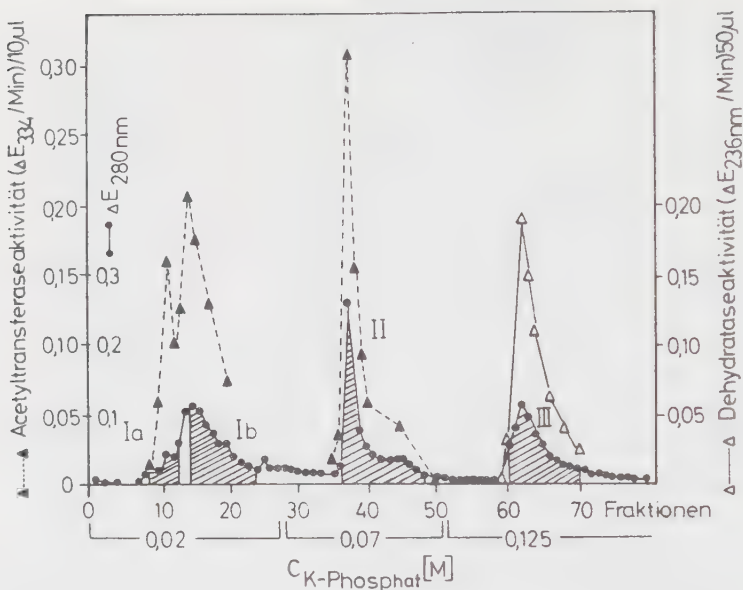


Abb. 21 : Chromatographische Auftrennung der Acetyltransferase und der Dehydratase an Hydroxylapaptit.
 Säule: 1,3 cm $\varnothing$, Gelbetthöhe: 15 cm, Puffer: 0,02 M KPO_4 pH 7,0, Proteinmenge: 27,5 mg Fr. II (Abb. 20), Temperatur: 4 $^{\circ}$ C, Durchfluß: 3 ml/Min, Fraktionsvolumen: 9 ml.
 Stufengradienten mit 0,02 M KPO_4 pH 7,0 (Gipfel Ia und Ib).
 1. Stufe: 0,07 M KPO_4 pH 7,0 (Gipfel II) und 2. Stufe: 0,125 M KPO_4 pH 7,0 (Gipfel III).

Die Abbildung 22 zeigt die Auftrennung der Acetyltransferase und der Dehydratase an Hydroxylapaptit auf der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Der Proteingipfel II unterschied sich von Ia und b durch eine zusätzliche kleine Bande im SDS-Gel (Abb. 22), die als ein kleineres Acetyltransferasebruchstück identifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 6.1.1.3.). Die Proteingipfel Ia und Ib (Abb. 21) ließen sich nach der Diskgelelektrophorese (Abb. 23), nach der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 22), nach den enzymatischen Aktivitäten (Tab. 6) und nach der N-terminalen Endgruppenbestimmung (siehe Abschnitt 5.5) nicht unterscheiden. Das Auftreten des Doppelpeaks (Abb. 21) kann dahingehend gedeutet werden, daß sich die Polypeptide der beiden Proteingipfel Ia und Ib geringfügig in ihrer C-terminalen Aminosäuresequenz unterscheiden.

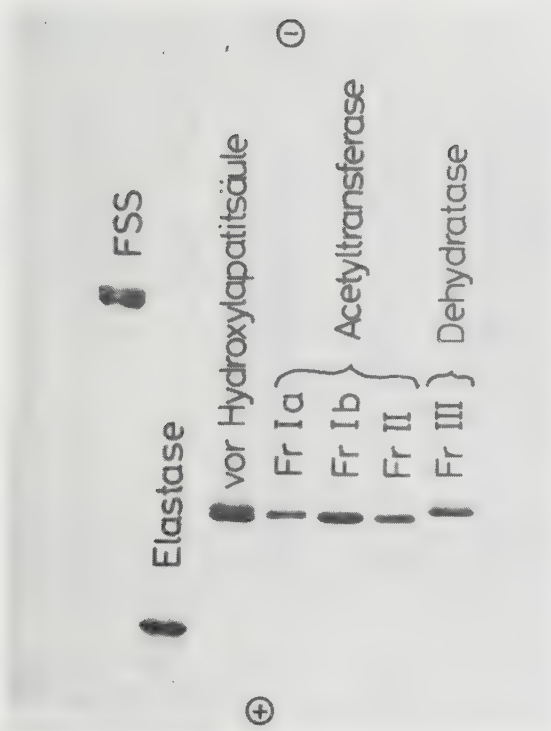


Abb. 22: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (5-15 % Acrylamid) der Proteinfractionen nach Auftrennung von Acetyltransferase und Dehydratase an Hydroxylapatit. Es wurden jeweils 11 - 13 μ g Protein aufgetragen.

Mit Hilfe der Diskgelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen (Abb. 23) und der analytischen Ultrazentrifugation (Abschnitt 5.1.3.) konnte gezeigt werden, daß sowohl die Acetyltransferasekomponente wie die Dehydratasekomponente im enzymatisch aktiven Zustand als Monomere vorliegen.

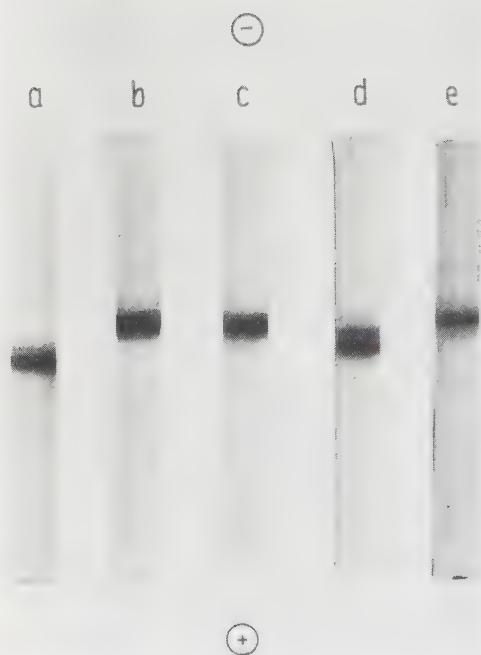


Abb. 23: Diskgelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen, System Maurer I (59). Jeweils ca. 7-10 µg Aliquote wurden auf 7,5 %igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisiert.
a: Proteingipfel II des Ultrogelschrittes 2 (Abb. 20)
b-e: Proteingipfel des Hydroxylapatschrittes (Abb. 21)
b: Proteingipfel Ia (ATC)
c: Proteingipfel Ib (ATC)
d: Proteingipfel II (ATC)
e: Proteingipfel III (DHC)

4.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Das Herausschneiden enzymatisch aktiver Bruchstücke aus der multifunktionellen Polypeptidkette β stellt eine Anreicherung des jeweiligen Teilenzym dar. Die Isolierung der β -Kette aus dem Multienzymkomplex $\alpha_6\beta_6$ ergibt eine theoretische Anreicherung für die Acetyltransferase sowie die Dehydratase um den Faktor 2. Ein Polypeptidfragment mit einem Molekulargewicht von 52 000 bzw. 53 000 Dalton (siehe Abschnitt 5.1.) aus der β -Kette (MG: 180 000) stellt eine weitere Anreicherung um den Faktor 3,5 dar. Insgesamt ergibt sich für die Acetyltransferase- wie die Dehydratasekomponente eine theoretische Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität um das 7-fache. Tatsächlich erhöhte sich die spezifische Aktivität der Acetyltransferasekomponente um den Faktor 9, die der Dehydratasekomponente um das 3 1/2-fache gegenüber dem nativen Enzymkomplex (Tab. 6, Abb. 24).

native PSS	Dialysierte Proteingipfel nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung der Anreicherungsschritte						
	Ultragelschritt		Hydroxylapatitschritt				
	1	2	Ia	Ib	II	III	
	III	II	Ia	Ib	II	III	Proteingipfel
2000	117	45	6	9	8	5	Proteinmenge (mg)
4000 2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	Aktivität (E) Gesamt- spez. Akt. (E/mg) synthese
11400 5,7	2223 19	1395 31	318 53	468 52	360 45	5 1	Aktivität (E) Acetyltrans- spez. Akt. (E/mg) ferase
2000 1	35 0,3	4 0,1	1 0,2	3 0,3	2 0,3	0 0	Aktivität (E) Malonyl- spez. Akt. (E/mg) transferase
2800 1,4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	Aktivität (E) β -Ketoacyl- spez. Akt. (E/mg) reduktase
4800 2,4	398 3,4	121 2,7	0	0	0	41 8,3	Aktivität (E) Dehydra- * spez. Akt. (E/mg) tase
2200 1,1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	Aktivität (E) Enoylre- duktase

Tab. 6 : Enzymatische Aktivitäten und Ausbeuten bei der Anreicherung der Acetyltransferase (Proteingipfel Ia, Ib und II) und der Dehydratase (Proteingipfel III) nach der Elastaseverdauung von 2g Fettsäuresynthetase aus Hefe.

Der Proteingipfel II unterschied sich vom Proteingipfel I (a und b) durch geringe Mengen eines zusätzlichen kleineren Acetyltransferasebruchstücks. Alle in Abschnitt 4 gezeigten Ergebnisse der Gewinnung und Reinigung zweier Teilenzyme durch limitierte Proteolyse des Multienzymkomplexes konnten mit den üblichen Schwankungen der spezifischen enzymatischen Aktivitäten ($\pm 10\%$) immer reproduziert werden.

Die Anreicherung der beiden Teilenzyme der Polypeptidkette β ist in Abb.31 schematisch zusammengefaßt.

Die geringe Malonyltransferaseaktivität (2% der Acetyltransferaseaktivität) der Acetyltransferasebruchstücke läßt sich durch geringe Mengen an Acetyl-CoA in der Malonyl-CoA- Testlösung erklären (Abschnitt 7.1.4.2.c).

Eine Verunreinigung bzw. das Vorhandensein von geschädigtem Malonyltransferaseenzym muß ausgeschlossen werden, da sich die Acetyltransferasebruchstücke nicht mit 1,3- ^{14}C -Malonyl-CoA beladen ließen (Abschnitt 6.2.). Die geringe Acetyltransferaseaktivität in Proteingipfel III (DHC) nach dem Hydroxylapatitschritt muß als 2 %ige Verunreinigung durch Proteingipfel I angesehen werden (Abb. 24)

* bezogen auf 5 mM D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein

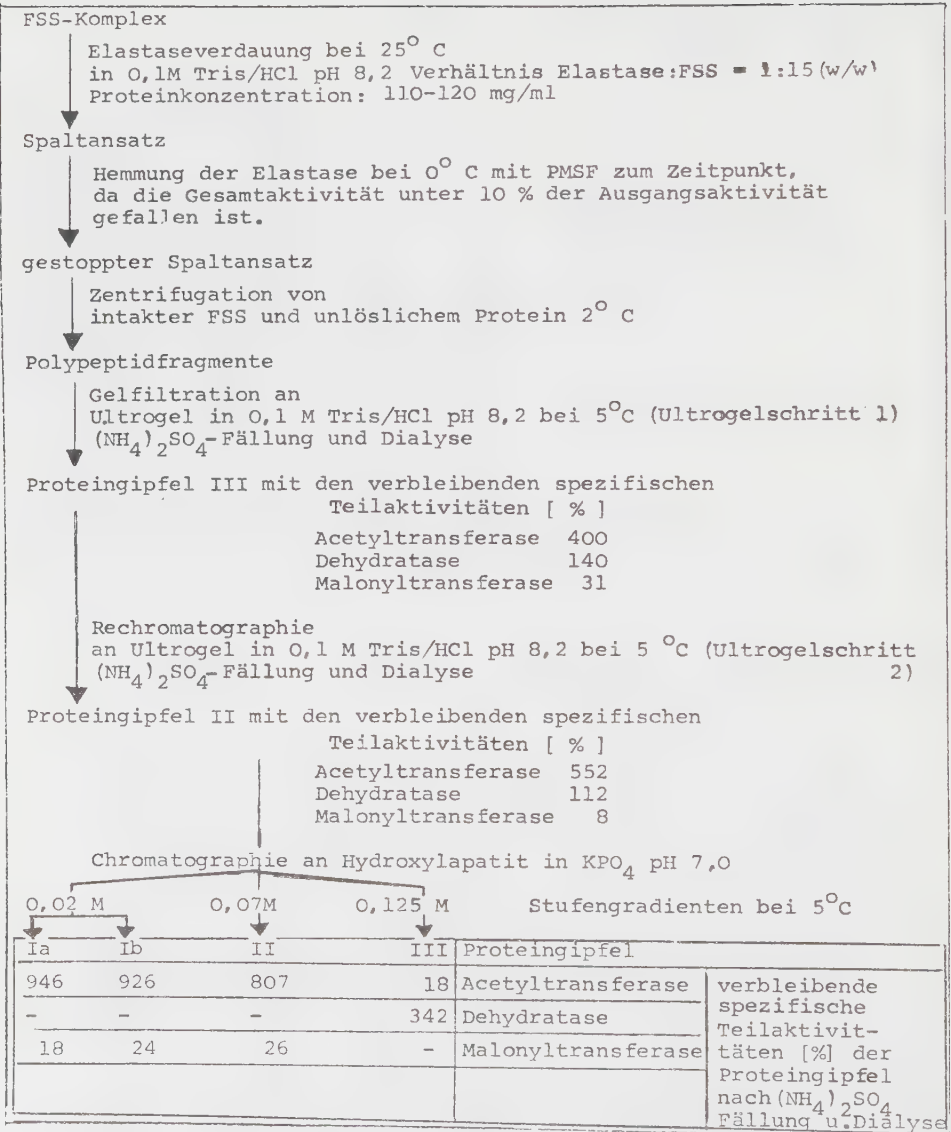


Abb. 24 · Anreicherungsschema der Acetyltransferase (Ia, Ib, II) und der Dehydratase (III). Die spezifischen Aktivitäten in % beziehen sich auf die spezifischen Ausgangsaktivitäten nativer FSS.

5. Charakterisierung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

5.1. Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

5.1.1. Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts nach Yphantis (97).

a) Das Acetyltransferasebruchstück

Die Zentrifugationsgeschwindigkeit lag beim Erreichen des Sedimentationsgleichgewichtes des Acetyltransferasebruchstücks bei 11 000 rpm. Die logarithmische Auftragung der Proteinkonzentration gegen das Quadrat des Abstandes vom Rotationszentrum ergab eine Gerade, die nur zum Boden der Meßzelle eine Aufwärtsskrümmung besaß (Abb. 25). Aus der Steigung der Geraden wurde ein Molekulargewicht von $52 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$ Dalton gefunden.

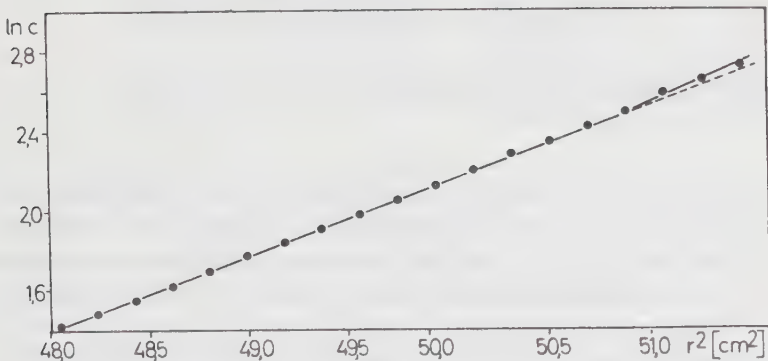


Abb. 25 : Auswertung der Gleichgewichtssedimentationszentrifugation des Acetyltransferasebruchstücks

*

Herrn Dr. H. Prieß, MPI für Biochemie, Martinsried, bin ich für die Durchführung der Molekulargewichtsbestimmungen durch Gleichgewichtssedimentationszentrifugation zu großem Dank verpflichtet.

b) Das Dehydratasebruchstück:

Für das Dehydratasebruchstück wurde ein Molekulargewicht von $53 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$ Dalton ermittelt (Abb.26).

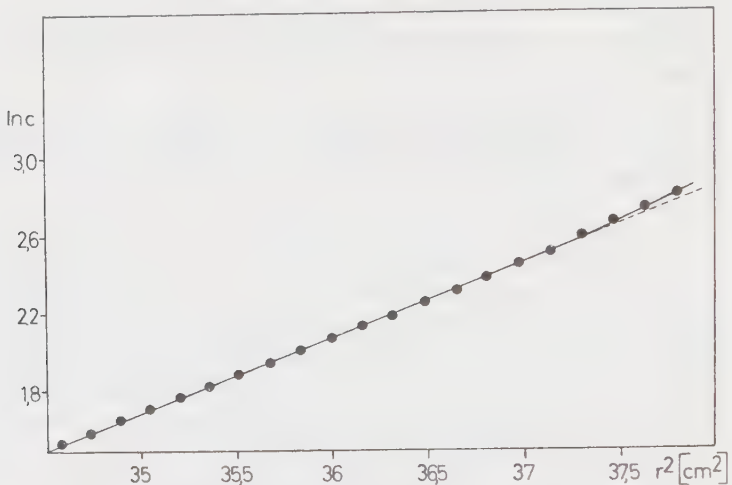


Abb. 26: Auswertung der Gleichgewichtssedimentationszentrifugation des Dehydratasebruchstücks

5.1.2. Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Molekulargewicht eines monomeren Proteins kann bestimmt werden durch die relativen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten im SDS-Polyacrylamidgel. Die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-beladenen Polypeptidkette wird mit den Geschwindigkeiten von Proteinen bekannten Molekulargewichts verglichen (60).

Aus der SDS-elektrophoretischen Untersuchung mit einem linearen Acrylamidgradienten (61) ergab sich für das Acetyltransferasebruchstück ein Molekulargewicht von 56×10^3 und für das Dehydratasebruchstück von $57,5 \times 10^3$ Dalton (Abb. 27).

5.1.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Für das Acetyltransferasebruchstück ergab sich nach der Methode der Gleichgewichtssedimentationszentrifugation ein Molekulargewicht von 52 000 Dalton, während nach der elektrophoretischen Untersuchung im SDS-Polyacrylamidgel 56 000 Dalton gefunden wurden.

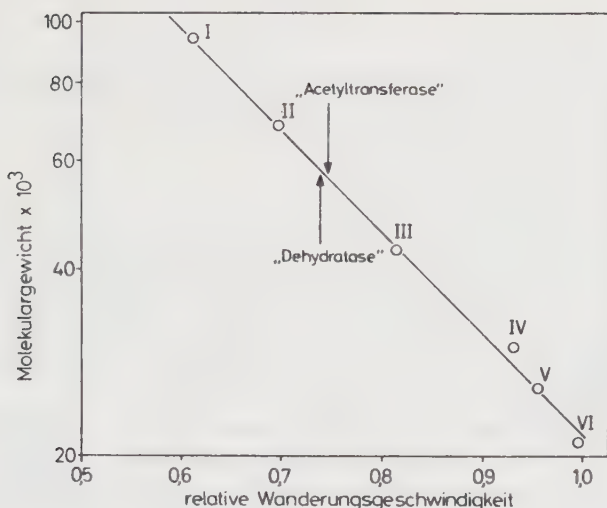


Abb. 27: Auswertung des SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (5-15 % Acrylamid) mit Eichproteinen und den beiden Bruchstücken.
 I: Phosphorylase B (94000) aus Kaninchenmuskel
 II: Rinderserumalbumin (68000)
 III: Ovalbumin (43000), IV: Carboanhydrase (30000) aus Rindererythrozyten, V: Elastase (25800) aus Schweinepankreas, VI: Trypsininhibitor (21000) aus Sojabohnen. Alle Proteine mit Ausnahme der Elastase entstammen dem SDS-Page-Molekulargewichtsstandard von Bio-Rad.

Das Dehydratasebruchstück besaß nach dem Gleichgewichtslauf der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von 53000 Dalton, in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ergibt sich für die Polypeptidkette ein Molekulargewicht von 57500 Dalton.

Von den beiden Bestimmungsmethoden ist der Ermittlung des Molekulargewichts durch Gleichgewichtssedimentationszentrifugation der Vorzug zu geben, da das Beladungsverhältnis von Natriumdodecylsulfat an verschiedenen Proteinen auf Grund unterschiedlicher Hydrophobizität, Basizität und Polarität der Proteine abweichen kann (62,63).

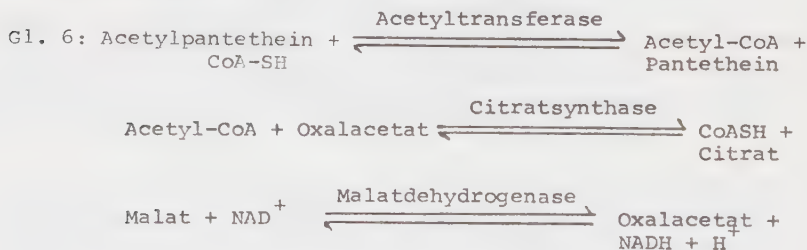
Mit den Übereinstimmenden Meßergebnissen der Molekulargewichtsbestimmungen nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichtes und der SDS-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß beide Enzymkomponenten (ATC und DHC) im enzymatisch aktiven Zustand als Monomere vorliegen.

5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

5.2.1. Acetyltransferasekomponente

Die Acetyltransferase kann nach Weithmann (13) optisch gemessen werden, indem von Acetylpantethein der Acetatrest mit Hilfe der Acetyltransferase auf freies Coenzym A übertragen wird. Oxalacetat und Acetyl-CoA können von der Citratsynthese zu Citrat umgesetzt werden, nicht jedoch Acetylpantethein (64).

Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Reaktion aus Malat und NAD^+ bis zum chemischen Gleichgewicht umgesetzt. Liegen die Enzyme Malatdehydrogenase und Citratsynthese im Überschuß vor, dann ist die Geschwindigkeit der Acetatübertragung von Acetylpantethein auf Coenzym A der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.



Oxalacetat wird in der Folge durch die Citratsynthese dem chemischen Gleichgewicht entzogen, wobei die Extinktionsänderung bei 334 nm durch Reduktion von NAD^+ verfolgt wird. Der optische Test der Acetyltransferase ist eine Zwei-Substratreaktion. Da sich die erforderlich hohen Konzentrationen von Coenzym A und Acetylpantethein nicht erreichen lassen, wurde die Methode von Florini und Vestling (65) angewendet.

Bei dieser Bestimmung der kinetischen Konstanten werden die Acetylpantethein-Konzentrationen konstant gehalten und die Coenzym A-Konzentrationen variiert. Die Auswertung nach Line-

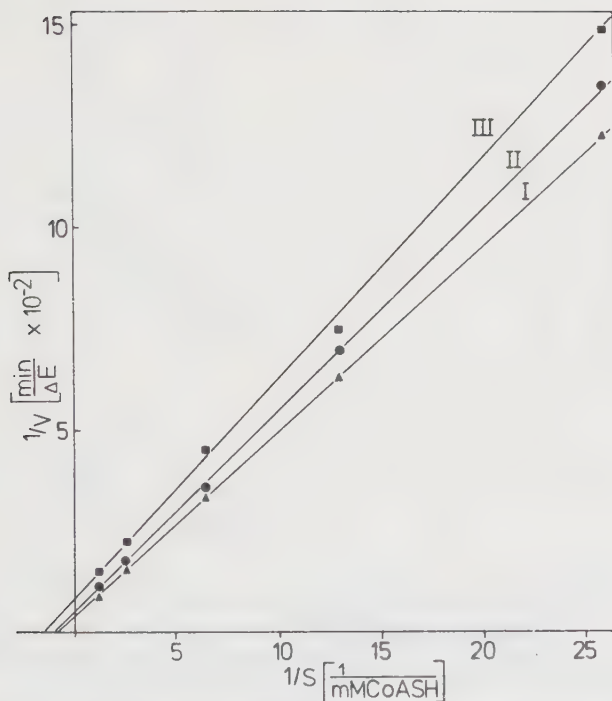


Abb. 28: Lineweaver-Burk-Geraden der Acetyltransferase, reziproke Coenzym A-Abhängigkeit mit den konstanten Acetylpanthethein-Konzentrationen 2,06 mM (I), 1,03 mM (II) und 0,515 mM (III). Getestet wurde mit 10,4 µg Acetyltransferasebruchstück.

weaver und Burk ergibt die $V_{\max}$ -Werte bei verschiedenen konstanten Acetylpanthethein-Konzentrationen (Abb. 28). Werden die reziproken $V_{\max}$ -Werte gegen die reziproken Acetylpanthethein-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 30), so lassen sich $V_{\max}$ - und K_M -Wert bei Acetylpanthethein-Sättigung ($1/S = 0$) ablesen.

Gleichermaßen wird mit konstanten Coenzym A-Konzentrationen und variablen Acetylpanthethein-Konzentrationen verfahren (Abb. 29 und 31).

Die Michaeliskonstante für Coenzym A betrug 1,3 mM, diejenige für Acetylpanthethein 1 mM.

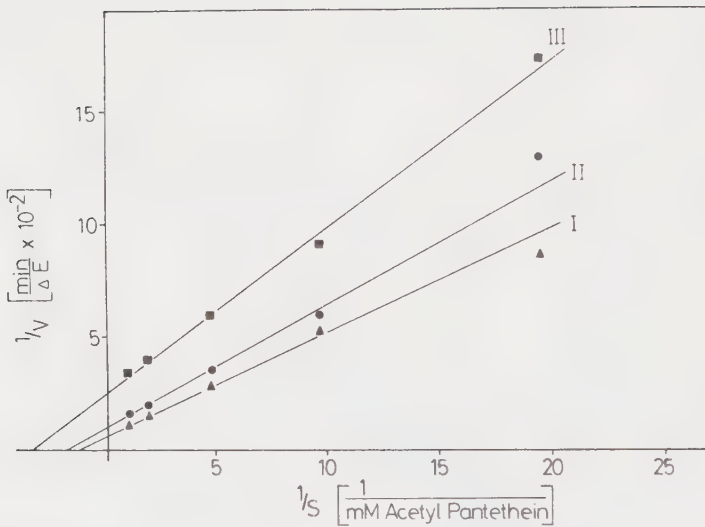


Abb. 29: Lineweaver-Burk-Geraden der Acetyltransferase, reziproke Acetylpantethein-Abhängigkeit mit den konstanten Coenzym A-Konzentrationen 1,548 mM (I), 0,774 mM (II) und 0,387 mM (III). Getestet wurde mit 10,4 μ g Acetyltransferasebruchstück

Nach Eggerer (66) ist der Betrag der Anfangsgeschwindigkeit des gekoppelten Tests (Gl. 6) gegenüber der einfachen Umsetzung von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat um den Faktor 2,6 vermindert. Für diesen experimentellen Befund wird die geringe stationäre Konzentration an Oxalacetat verantwortlich gemacht, die für eine Sättigung der Citratsynthese nicht ausreicht. Der mit dem Faktor 2,6 korrigierte $V_{\max}$ -Wert der Bestimmung nach Florini und Vestling entspricht einem Substratumsatz von $156 \pm 12 \mu\text{Mol}$ (Abb. 30) bzw. $160 \pm 30 \mu\text{Mol}$ (Abb. 31) Acetylpantethein pro min bezogen auf 1 mg ATC.

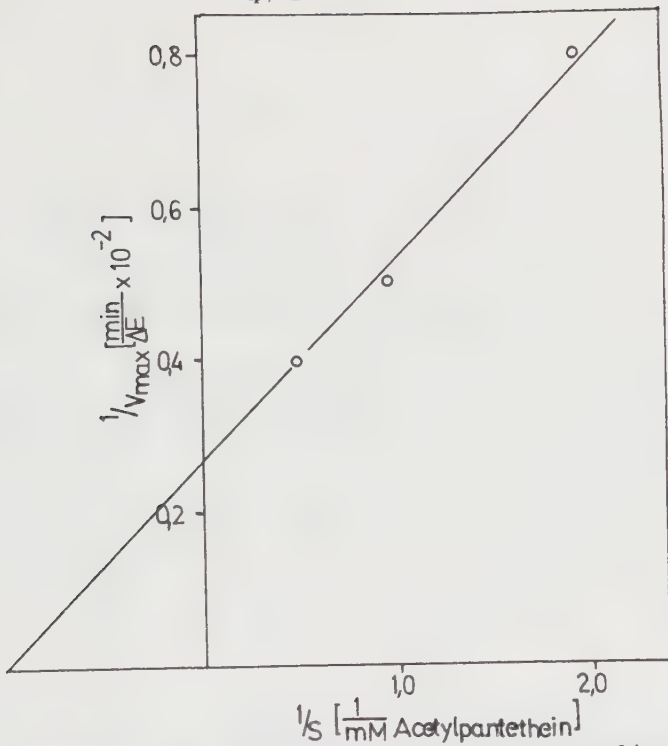


Abb. 30: Auswertung von Abb. 28 nach Florini und Vestling durch Auftragung der reziproken Acetylcholinesterase-Konzentrationen (I, II, III) gegen $1/v_{\max}$

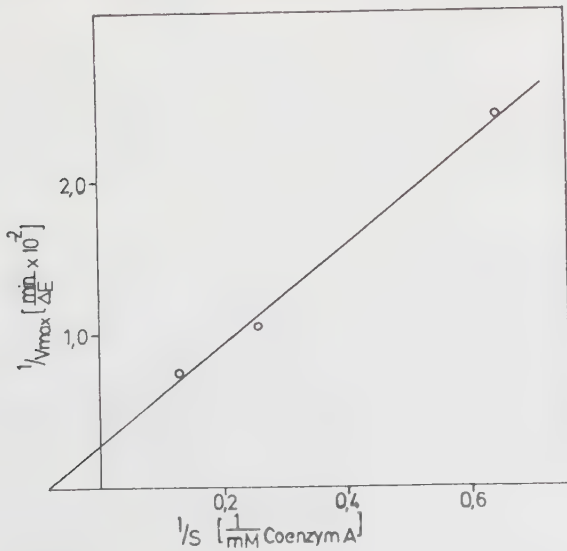


Abb. 31: Auswertung von Abb. 29 nach Florini und Vestling durch Auftragung der reziproken Coenzym A-Konzentrationen (I, II, III) gegen $1/v_{\max}$

5.2.2. Dehydratasekomponente

Die Substratabhängigkeit der Dehydrataseaktivität von DHC wurde mit D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein gemessen (Abb. 32). Im Vergleich zum nativen Enzymkomplex (Seite 14, Abb. 9) hat sich der Substratsättigungsbereich zu niedrigeren Modellsubstratkonzentrationen verschoben.

Aufgrund der beginnenden Substratsättigung im Löslichkeitsbereich von D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein konnte eine Auswertung nach Lineweaver-Burk bei der Dehydratasekomponente durchgeführt werden (Abb. 33).

Die reziproke Auftragung ergab einen K_m -Wert von 10 ± 5 mM und einen $V_{\max}$ -Wert der Dehydratisierung von 15 ± 4 μ Mol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein pro min bezogen auf 1 mg DHC.

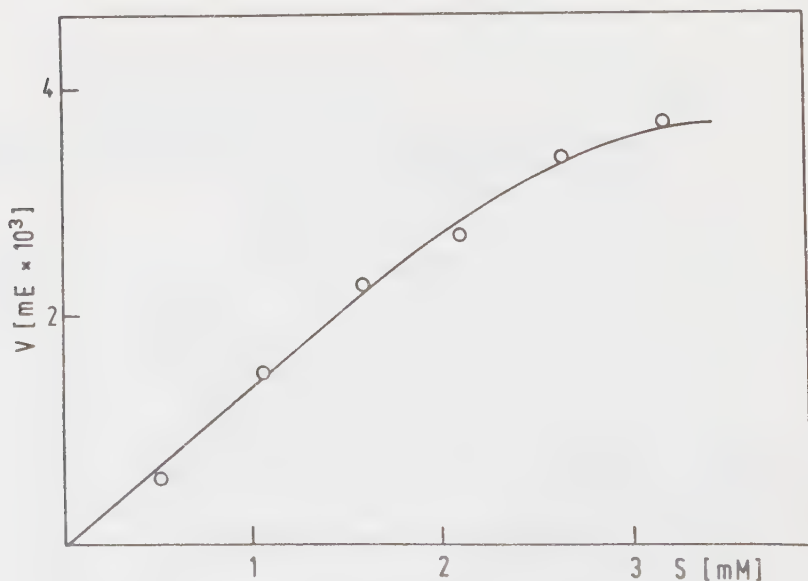


Abb. 32: Substratabhängigkeit für die dehydratisierende Enzymaktivität von DHC mit D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein und 10,25 μ g DHC

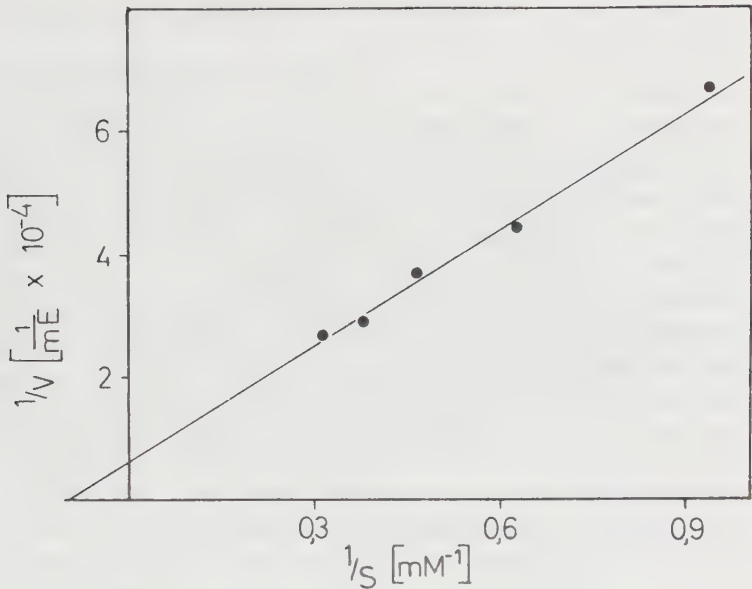


Abb. 33: Auswertung von Abb. 32 nach Lineweaver-Burk zur Ermittlung der Michaeliskonstanten von D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein für die Dehydrataseaktivität von DHC

5.2.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Auswertung der Lineweaver-Burk-Diagramme nach Florini und Vestling der Acetyltransferasereaktion (Gl. 6) von ATC ergab für Coenzym A als Acetyl-Akzeptor und Acetylpantethein als Acetyl-Donor Michaeliskonstanten gleicher Größenordnung (1 mM).

Die graphisch ermittelte maximale Geschwindigkeit der Transferasereaktion bei Sättigung mit beiden Substraten lag bei 160 μMol Substratumsatz pro min. Dieser Wert liegt um ein 3-faches über dem der spezifischen Aktivität von ATC bei Standardbedingungen der optischen Acetyltransferasemessung.

Am nativen Enzymkomplex war eine Auswertung der Substratabhängigkeit für die Dehydrataseaktivität nach Lineweaver-Burk nicht möglich, da im Löslichkeitsbereich des Modellsubstrates

D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein keine Substratsättigung auftrat.

Eine Auswertung der Substratabhängigkeit für die Dehydrataseaktivität nach Lineweaver-Burk konnte bei der Dehydratasekomponente vorgenommen werden. Es wurde ein K_m -Wert von 10 mM und ein V_{max} -Wert der Dehydratisierung von 15 μ Mol Modellsubstrat pro min bezogen auf 1 mg DHC ermittelt.

Das natürliche Substrat der Dehydratase ist an der nativen Fettsäuresynthetase kovalent an die zentrale SH-Gruppe gebunden. Die deutliche Verschiebung des Sättigungsbereiches der Substratabhängigkeit für das Dehydrataseenzym zu niedrigen Substratkonzentrationen beim Vergleich zwischen nativer FSS und DHC ließe sich dahingehend deuten, daß das Modellsubstrat leichter an das reaktive Zentrum des monomeren Polypeptidfragments diffundieren kann als in das Innere des ellipsoiden Hohlkörpers der Fettsäuresynthetase.

5.3. Bestimmung des isoelektrischen Punkts

5.3.1. Acetyltransferasekomponente

a) Isoelektrische Säulenfokussierung

Die Acetyltransferasekomponente wurde in Anwesenheit von Ampholyten in einem Rohrzuckerdichtegradienten mit 1 % (v/v) Nonidet einer Elektrofokussierung unterworfen. Durch langsames Abzapfen des Gradienten gelang es die scharf ausgeflockte Proteinbande ohne Verschmieren aus der Säule zu eluieren. Aufgrund der hohen UV-Absorption des Detergens Nonidet wurde nicht die Proteinkonzentration der Fraktionen, sondern die Acetyltransferaseaktivität gemessen. Der Aktivitätsgipfel der Acetyltransferase lag bei pH 5,2 (Abb. 34)

b) Isoelektrische Flachbettfokussierung

Das Acetyltransferasebruchstück wurde auf ein "PAG plate-" Polyacrylamidfertiggel mit LKB Ampholine pH 4,0-6,5 aufgetragen und elektrofokussiert. Nach dem Vermessen des pH-Gradienten auf dem Gel konnten die Proteinbanden angefärbt werden. Infolge der Denaturierung von Protein in der Nähe des isoelektrischen Punkts war die Proteinbande stark verschmiert. Es wurde die Entfernung von Anode zu dem Proteinteil vermessen, der im isoelektrischen Feld am weitesten gewandert war (Abb. 35). Für das Acetyltransferasebruchstück ergab sich ein scheinbarer isoelektrischer Punkt von pH 5,25.

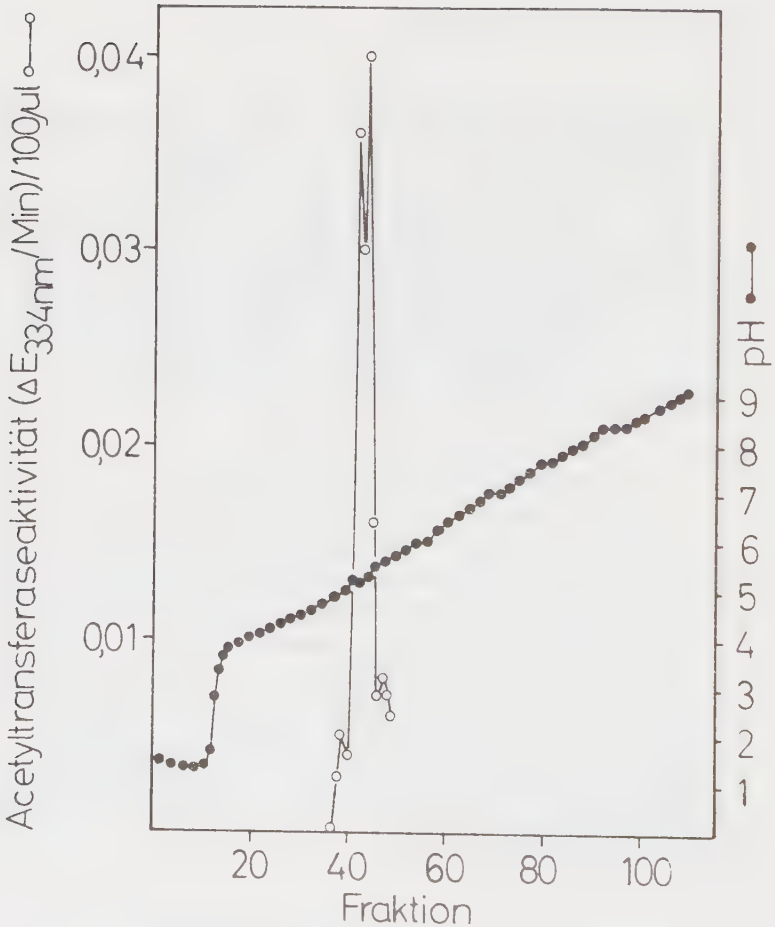


Abb. 34: Isoelektrische Säulenfokussierung (pH-Bereich der Ampholine: 3,5-10) im Rohrzkuckerdichtegradienten. 1,2 mg Acetyltransferase- und Dehydratasebruchstück (vor Hydroxylapatitauftrennung) wurden auf eine 110 ml Elektrofofriersäule (LKB) aufgetragen und mit 400 Volt, 3 mA bei 4°C 7 Std. fokussiert. Danach wurde der Rohrzkuckerdichtegradient (0-60%) in 640 μl Fraktionen aufgefangen und der pH gemessen. Mit je 50 μl 1 M KPO_4 pH 7,5 wurde der pH der Fraktionen auf pH 6,8-7,0 gebracht, wobei dann je 100 μl für den Acetyltransferasetest entnommen wurden.

5.3.2. Dehydratasekomponente

Die Dehydratasekomponente wurde unter den gleichen Bedingungen zusammen mit der Acetyltransferasekomponente auf einem "PAGplate"-Polyacrylamidfertiggel elektrofo-kussiert. Auch hier wurde der am weitesten gewanderte Teil der stark verschmierten Proteinbande vermessen (Abb. 35). Es wurde ein scheinbarer isoelektrischer Punkt von pH 5,8 gefunden

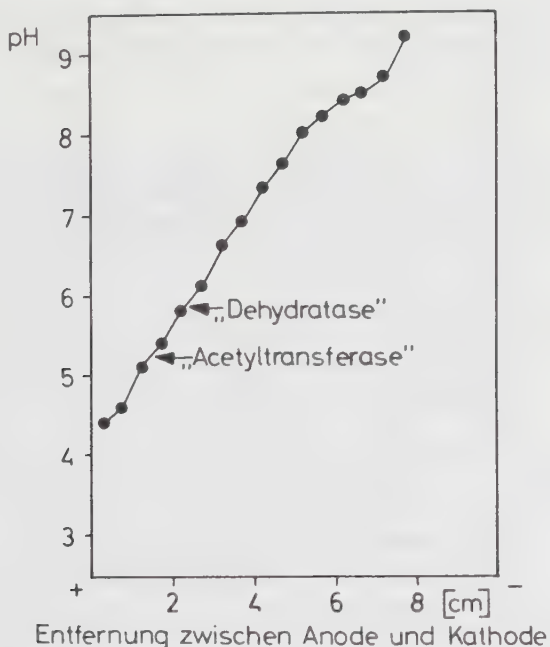


Abb. 35: Isoelektrische Flachbettfokussierung in "PAGplate" Polyacrylamidfertiggel (LKB) (pH-Bereich der Ampholine: 3,5-9,5). Es wurden je 70 μ g Acetyltransferase- und Dehydratasekomponente (Proteingipfel Ia und III nach Hydroxylapatitchromatographie) 105 Min. bei 4°C auf einer LKB "Multiphor" Flachbett-Elektrophoreseapparatur elektrofokussiert. Unter dem transparenten Gel lag eine Kunststoffolie mit zweidimensionaler Skaleneinteilung. Der pH-Gradient konnte mit einer Oberflächenelektrode auf der Skala vermessen werden. Nach dem Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel zur Ermittlung des isoelektrischen Punkts wieder auf die Skalenfolie gelegt.

5.4. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für Acetyl-CoA an der Acetyltransferasekomponente

Nach Auftrennung des Elastase-Spaltgemisches durch Gelfiltration an Ultrogel (Abschnitt 4.2.2.) wurden die Proteingipfel I, II und III mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA nach Engeser und Wieland beladen (67) und auf einem SDS-Polyacrylamid-Plattengel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Hauptbande des Proteingipfels III auf dem Polyacrylamid-Plattengel ist identisch mit der radioaktiven Bande der Autoradiographie des Gels (Abb. 36).

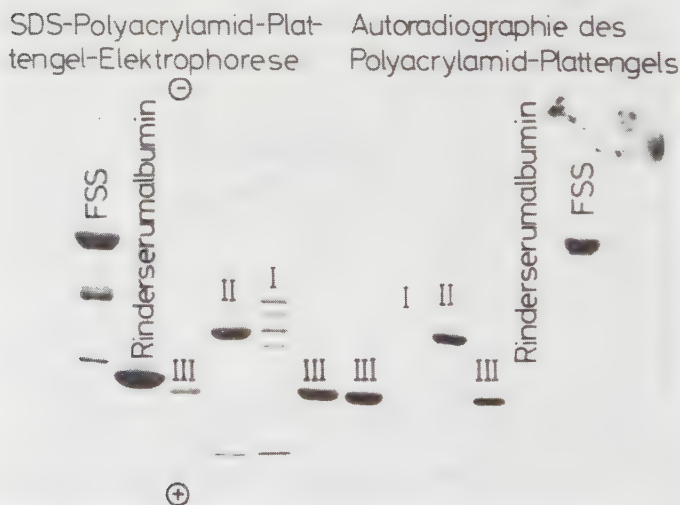


Abb. 36: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Elastase-Spaltansatzes nach Gelfiltration an Ultrogel Aca 44 und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA-Beladung. Autoradiographie der mit ^{14}C -Acetat beladenen Proteinbanden.

DTNB-Vorinkubation: je 0,4 mg FSS, RSA, Proteingipfel I, II und III, 1 mM DTNB, 30 Min, 25°C , 0,1 M Tris/HCl pH 7,5, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (44,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$)-Inkubation: Zugabe von je 60 nMol ^{14}C -Acetyl-CoA, 8 Min, 0°C .

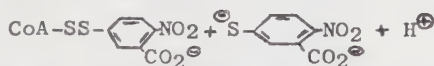
Nach Elektrophorese und Färbung des Gels, Autoradiographie des Gels nach Bonner und Laskey (68).

Bei der Ermittlung der Beladungszahl wurde mit einer Acetyltransferasekomponente gearbeitet, die noch nicht von der Dehydratasekomponente über Hydroxylapatit befreit war. Die Verunreinigung durch Dehydrataseaktivität betrug 17 %. Diese Tatsache wurde bei der Bestimmung der Molmenge Acetyltransferase berücksichtigt.

5.4.1. Radioaktive Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen

Für die stöchiometrischen Untersuchungen der Transferasen(20) am Multienzymkomplex mußten die zentralen und die peripheren SH-Gruppen mit DTNB blockiert werden, damit sich die Beladung wirklich nur auf die Transferasen beschränkte. Gleichzeitig zog die Bildung des Thiophenolat-Anions das chemische Gleichgewicht auf die rechte Seite (Gl.7)

Gl. 7:



Für die Acetyltransferasekomponente (Teil der β -Kette) war eine vorhergehende Blockierung der zentralen und peripheren SH-Gruppe (α -Kette) nicht notwendig. Außerdem zeigte sich das Acetyltransferasefragment der DTNB-Titration gegenüber empfindlicher als der native Komplex. In klaren Proteinlösungen mit 1 mM DTNB traten nach 30 Min. Trübungen auf. Aus diesem Grund wurde die Beladung der Acetyltransferasekomponente mit ^{14}C -Acetyl-CoA ohne vorherige DTNB-Inkubation durchgeführt.

Alle Versuche zur Ermittlung der Beladungszahl mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA konnten wir nach folgender Methode durchführen:

Das Acetyltransferasebruchstück wurde bei 0°C mit ^{14}C -Acetyl-CoA bekannter spezifischer Radioaktivität inkubiert. Danach stoppten wir die Beladung durch Zugabe von festem Guanidinhydrochlorid (Endkonzentration: 5 M). Nach Abtrennung des radioaktiven Proteins von niedermolekularer Radioaktivität durch Gelfiltration (siehe exp. Teil) wurde

Äq ^{14}C -Acetat/Äq Protein bestimmt. Auf Grund der Deacylaseaktivität der Acetyltransferase mußte die optimale Inkubationszeit des Proteins mit Acetyl-CoA gefunden werden. Sie betrug 8 Minuten (Abb.37).

Die Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Beladungsbedingungen (Abb. 37 und 38) wurden mit Proteinproben durchgeführt, deren spezifische Acetyltransferaseaktivität durch häufiges Auftauen und Einfrieren um ca. 20 % gesunken war.

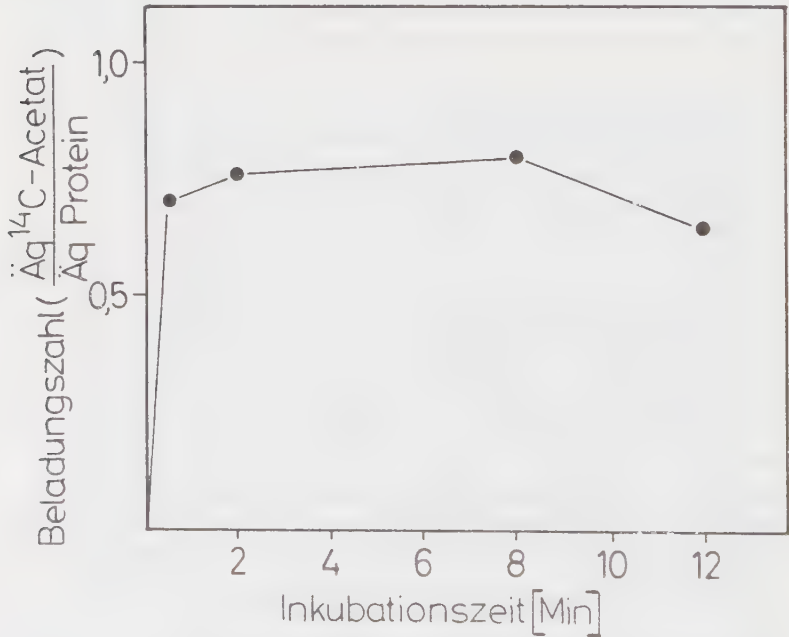


Abb. 37: Einfluß der Inkubationsdauer von Acetyl-CoA auf die Beladungszahl der Acetyltransferasekomponente

Inkubation von je 3,2 nMol ATC in 0,1 M KPO_4 -Puffer bei 0°C mit 148 nMol 1- ^{14}C -Acetyl-CoA (44,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) Abgestoppt wurde nach 30 sec, 2 min, 8 min und 12 min mit festem GuHCl 5 M
Aufgetragen auf Sephadex G50 Säule ($\varnothing=6\text{mm}$, Gelbett-höhe: 10 cm, Puffer: 0,1 M KPO_4 pH 6,5, 5 M GuHCl , Fraktionsvolumen: 240 μl
Proteinbestimmung der Fraktionen nach (69): je 50 μl Fraktionsaliquote, Radioaktivitätsbestimmung: je 150 μl Fraktionsaliquote + 5 ml Unisolve

Abb. 38 zeigt die Abhängigkeit der Beladungszahl von der Überschußmenge Acetyl-CoA. Ab einem 30-fachen Überschuß an Acetyl-CoA können die Beladungsbedingungen als optimal angesehen werden.

Unter optimalen Bedingungen der Beladung konnte ein Mol-verhältnis von radioaktiv gebundenem Acetat zu Protein wie 0,95 zu 1 ermittelt werden (Versuchsbeschreibung und quantitative Auswertung: siehe exp. Teil Seite 113 Abb. 55).

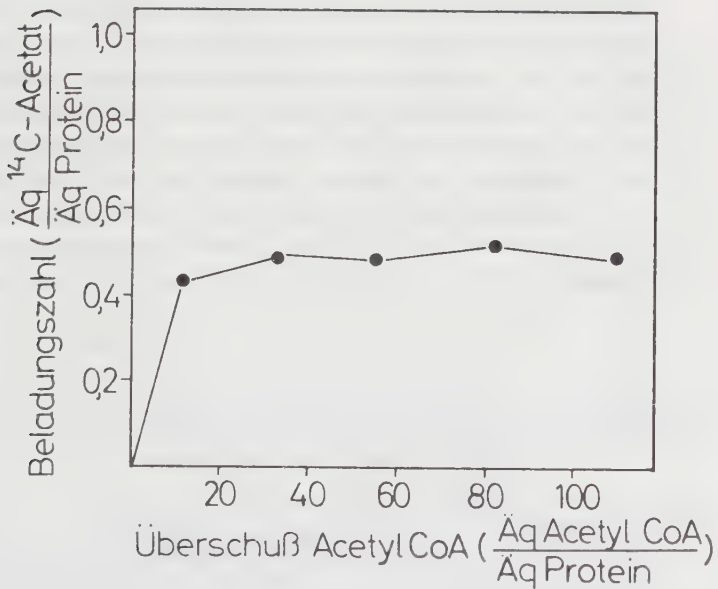


Abb. 38: Einfluß des molaren Verhältnisses von Acetyl-CoA und Protein im Inkubationsansatz auf die Beladungszahl.

Inkubation von je 3,2 n Mol ATC in 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5 bei 0 °C mit verschiedenen Mengen $1-[^{14}C]$ -Acetyl-CoA (44,1 $\mu Ci/\mu Mol$)

Abgestoppt nach 8 Min mit festem $GuHCl$ 5 M. Aufgetragen auf Sephadex G50 Säule ($\varnothing=6mm$, Gelbethöhe: 24 cm, Puffer: 0,1 M KPO_4 pH 6,5, 5 M $GuHCl$, Fraktionsvolumen: 500 μl)

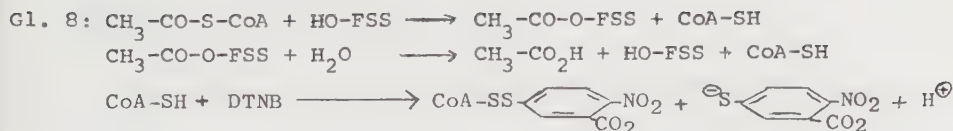
Proteinbestimmung der Fraktionen nach (69): je 50 μl Fraktionsaliquote, Radioaktivitätsbestimmung: je 300 μl Fraktionsaliquote

Nach Ziegenhorn (33) wird im aktiven Zentrum der Acetyltransferase der Essigsäurerest auf einen Serinrest übertragen. Nach einer von Sanger (71) eingeführten Methode können durch Perameisensäureoxidation Sauerstoffester von Thioestern unterschieden werden, in dem der Thioester durch Perameisensäure zerstört wird, während der Sauerstoffester gegenüber diesem Oxidationsmittel stabil bleibt. Die Stabilität der Acetatbindung gegenüber Perameisensäure wurde im Experiment geprüft (Einzelheiten siehe exp. Teil): Durch Gelfiltration wurde das mit 1-[¹⁴C]-Acetyl-CoA beladene Protein unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert, und zu gleichen Teilen mit Perameisensäure und Ameisensäure behandelt. Nach der Lyophilisation lösten wir die beiden Proben in wenig Puffer und reinigten sie erneut durch Gelfiltration. Am Perameisensäure behandelten Protein fanden sich gegenüber dem Ameisensäure behandelten Protein 106% radioaktiv gebundenes Acetat. Damit ist gesichert, daß am isolierten Bruchstück keine Acetatreste über Thioesterbindungen verknüpft sind.

5.4.2. Optische Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität mit DTNB

Bei Beladung der Acetyltransferase mit Acetyl-CoA wird CoA-SH frei, das gemäß Gleichung 7 (Seite 55) mit DTNB im Überschuß quantitativ abreagieren kann. Die Beladungszahl kann optisch durch die Absorption des Thiophenolat-Anions gemessen werden (36, 72).

Nach Oesterhelt und Sumper (4) dient diese Bestimmungsmethode auch zum Nachweis einer katalytischen Nebenreaktion der Fettsäuresynthetase, nämlich der Deacylierung von Acetyl-CoA (Gl. 8).



Die Acylierung und die Deacylierung können mit DTNB in einem kontinuierlichen Test bei 405 nm ($\epsilon = 13\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt werden. Nach dem Start mit Acetyl-CoA beobachtet man den steilen Extinktionsanstieg der Acylierung des Enzyms und dann einen weniger steilen linearen Anstieg der Deacylierung des Enzyms.

Die Acetyl-CoA Lösungen wurden vor den Messungen durch Nachacylierung mit Acetanhydrid von freiem Coenzym A befreit und der Thioestergehalt enzymatisch neu bestimmt (66). Wir führten die Bestimmung der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität mit der Acetyltransferasekomponente und nativer Fettsäuresynthetase durch, da die Versuchsanordnung der Bestimmung im Vier-Küvetten-System nach Sumper (4) geändert werden mußte und wir die Deacylaseaktivität von nativer Fettsäuresynthetase und Acetyltransferasekomponente vergleichen wollten.

Folgende Veränderungen wurden vorgenommen:

- 1) Die Enzympräparate wurden nur 20 min in 1 mM Ellmans Reagenz (DTNB) vorinkubiert, da sich die ATC-Lösungen 30 min nach der DTNB-Inkubation zu trüben begannen.
- 2) Da mit der höheren spezifischen Acetyltransferaseaktivität des Bruchstücks eine höhere Deacylaseaktivität einher ging, konnte bei 25°C zwischen dem schnellen Extinktionsanstieg der Acylierungsaktivität und dem linearen Lauf der Deacylaseaktivität nicht eindeutig unterschieden werden. Deshalb mußte zur Verminderung der enzymatischen Aktivität die Messung im optischen Test bei 10°C durchgeführt werden.

Abbildung 39 und 40 zeigen den zeitlichen Extinktionsverlauf der Acetylbeladung mit DTNB von Acetyltransferasekomponente und nativer Fettsäuresynthetase bei 10°C. Durch

Extrapolation des Deacylaseextinktionsverlaufes zum Zeitpunkt 0 kann die durch Acetatbeladung verursachte Extinktionsänderung abgelesen werden.

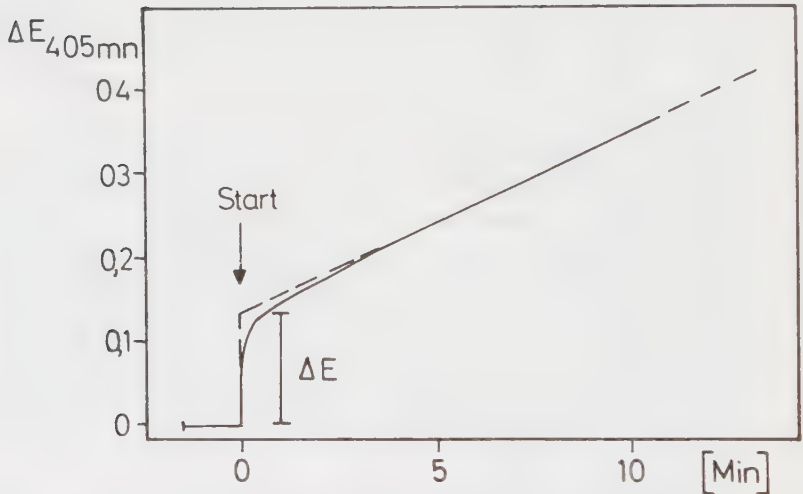


Abb. 39: Zeitlicher Extinktionsverlauf der Beladung der Acetyltransferasekomponente mit Acetyl-CoA
Inkubation von ATC in 1 mM DTNB 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5, 20 min bei 25°C
Beladung von 11,7 nMol Acetyltransferasebruchstück (612 μg) zum Zeitpunkt 0 mit 985 nMol Acetyl-CoA im 4-Küvetten-system à 1 ml nach (4) bei 10°C.

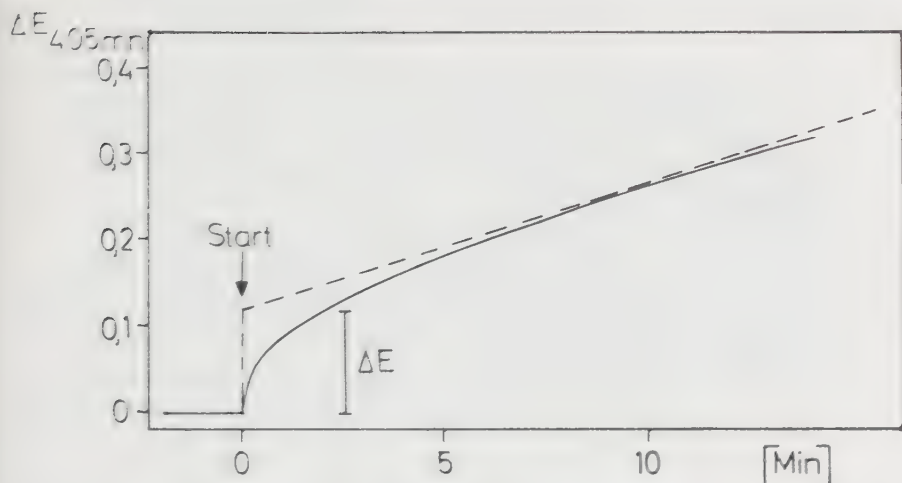


Abb. 40: Zeitlicher Extinktionsverlauf der Beladung von FSS mit Acetyl-CoA und Deacylierung in Gegenwart von DTNB.
Inkubation von FSS in 1 mM DTNB 0,1 M KPO₄ pH 6,5
Beladung von 1,4 nMol FSS (3,28 mg) zum Zeitpunkt 0 mit 985 nMol Acetyl-CoA im 4-Küvettensystem à 1 ml nach (4) bei 10°C.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der optischen Bestimmung der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität zusammengefaßt. Die Beladungszahl für die Fettsäuresynthetase ließ sich in Abbildung 40 nur grob abschätzen, sie lag bei 6 Acetatbindungsstellen pro FSS-Molekül.

Fettsäure-synthetase	Acetyltransferasekomponente		
4,3 - 5,4*	0,87	Beladungs-zahl	$\frac{\text{Mol geb. Acetat}}{\text{Mol Enzym}}$
$4,3 \times 10^{-3}$	39×10^{-3}	Deacylaseaktivität	$\frac{\Delta E_{405 \text{ nm}}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}}$

Tabelle 7: Ermittelte Acetatbindungsstellen und Deacylaseaktivitäten von FSS und ATC nach dem optischen Test mit Ellmans Reagenz (4).

*Die Anzahl der im optischen Test (4) ermittelten Acetatbindungsstellen der FSS wurden von Engerer (20) übernommen.

5.4.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Mit der beschriebenen radioaktiven Bestimmungsmethode konnte für die Acetyltransferasekomponente der Hefe-Fettsäuresynthetase eine Beladungszahl von 0,95 , mit der optischen Methode eine Beladung von 0,87 Acetatresten pro Proteinmolekül gefunden werden.

Der höhere Wert der radioaktiven Bestimmungsmethode ohne DTNB läßt sich dadurch erklären, daß bei der optischen Bestimmungsmethode während der Inkubation das monomere Acetyltransferaseenzym durch DTNB geringfügig inaktiviert wird. Aufgrund der experimentellen Befunde kann angenommen werden, daß das angereicherte Acetyltransferaseteilenzym ein reaktives Zentrum besitzt.

Es konnte gezeigt werden, daß mit der 9-fachen Anreicherung der spezifischen Acetyltransferaseaktivität von ATC aus der Fettsäuresynthetase eine 8-fache Anreicherung der spezifischen Deacylaseaktivität verbunden ist.

Die Oesterhelt'sche Deutung der Deacylaseaktivität als Nebenreaktion des Acetyltransferaseenzyms konnte damit bestätigt werden. Das heißt, bei Abwesenheit des natürlichen Acetat-Akzeptors (zentrale SH-Gruppe) oder eines geeigneten Thiols wird der Acetylrest am Serin im reaktiven Zentrum der Acetyltransferase in Gegenwart von DTNB verseift.

5.5. Endgruppenbestimmung des N-Terminus der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

Ein Kriterium für die Reinheit eines Polypeptids ist das Auftreten einer einzigen N-terminalen Aminosäure.

Bei der Endgruppenanalyse nach Hartley (73) und Gray (74) werden freie NH_2 -Gruppen der N-terminalen Aminosäuren, sowie die NH_2 -Seitengruppe von Lysin und die OH-Gruppe des Tyrosins durch Reaktion mit Dansylchlorid in säurestabile, fluoreszierende Dansyl-(DNS)-Derivate überführt. Nach salzsaurer Hydrolyse werden die gegebenenfalls auftretenden DNS-Aminosäuren auf doppelseitig beschichteten Polyamidplättchen identifiziert.

5.5.1. Ergebnisse der N-terminalen Analyse

Mit den von uns verwendeten Dünnschichtplatten gelang die Trennung aller zu erwartenden DNS-Derivate auf 3 x 3 cm Platten. Günstigste Nachweismenge für die DNS-Aminosäure des Polypeptids war 50 Picomol. Nach Dansylierung und Hydrolyse des pankreatischen Trypsininhibitors (Trasylol®)* zeigte sich auf den Dünnschichtplatten bei der Endgruppenanalyse nur der tiefgelbe Fleck von DNS-Arginin (75), neben DNS-NH_2 und großen Mengen DNS-OH .

Die Experimente an der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente zeigten, daß bei beiden Proteinfragmenten nur eine N-terminale Aminosäure vorhanden ist.

Das Acetyltransferasefragment (Proteingipfel Ia und Ib) trug N-terminal Cystein, das Dehydratasefragment (Proteingipfel III) trug Glutaminsäure.

5.5.2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente (Proteingipfel Ia, Ib und III des Hydroxylapatitschrittes) konnten

* Trasylol® wurde mir freundlicherweise von Bayer-Leverkusen zur Verfügung gestellt.

nach der Endgruppenbestimmung N-terminal als einheitliche Proteinfragmente mit den Endgruppen Cystein bzw. Glutaminsäure angesehen werden. Gestützt wird dieses Ergebnis durch die Befunde von Sampath Narayanan und Anwar (77), nach denen Elastase aus Schweinepankreas die oxidierte Insulin B-Kette unter anderem bevorzugt zwischen Val-Cys und Val-Glu spaltete.

Nach Schweizer sind die N-terminalen Aminosäuren von α - und β -Kette blockiert (76). Danach trug weder die Acetyltransferase- noch die Dehydratasekomponente den N-Terminus der β -Kette.

6. Untersuchungen zur Struktur der Fettsäuresynthetase

6.1. Immunologische Untersuchungen

6.1.1. Immunologische Lokalisierung der Acetyltransferase und der Dehydratase auf den Untereinheiten der Fettsäuresynthetase

6.1.1.1. Herstellung von Kaninchenantikörpern gegen die Acetyltransferase-Komponente (ATC) und die Dehydratasekomponente (DHC) der Fettsäuresynthetase

Mit den gereinigten Spaltstücken der Elastaseverdauung wurden Kaninchen immunisiert. Nach 9 Wochen und je 7 Impfungen ergaben sich im Ouchterlony-Diffusions-Test (80) für die Seren folgende Titer: Anti-ATC-Serum 1:16, Anti-DHC-Serum 1:4. Nach Fällung der Seren mit Ammoniumsulfat (40 % der Sättigung) und anschließender Dialyse wurden die γ -Globuline durch Chromatographie an Sephadex G150 in die Immunglobulinfraktionen M, A und G aufgetrennt (81). Den Nachweis reiner IgG-Fraktionen aus den Seren erbrachte die SDS-Gelelektrophorese; unter reduktiven Bedingungen waren jeweils nur die zwei Banden der H- und L-Ketten der Immunglobuline G zu beobachten.

6.1.1.2. Spezifität der Antikörper

Die Acetyltransferase und die Dehydratase konnten bisher auf genetischer Basis (82) und durch Messung enzymatischer Aktivitäten der isolierten Untereinheiten (19) der β -Kette zugeordnet werden. Die Acetyltransferase ließ sich auch proteinchemisch der β -Kette zuordnen (67).

In Übereinstimmung mit den Befunden von Schweizer und Wieland bildeten die gereinigten Antikörper der Acetyltransferasekomponente (Anti-ATC-IgG) und der Dehydratasekomponente (Anti-DHC-IgG) keine Präzipitation mit der α -Kette der Hefe-Fettsäuresynthetase (Abb. 41 und Abb. 42).

* Herrn Dr. F. Wieland, Universität Regensburg, bin ich für die Überlassung der Untereinheiten α und β aus Hefe-Fettsäuresynthetase nach (19) zu großem Dank verpflichtet.

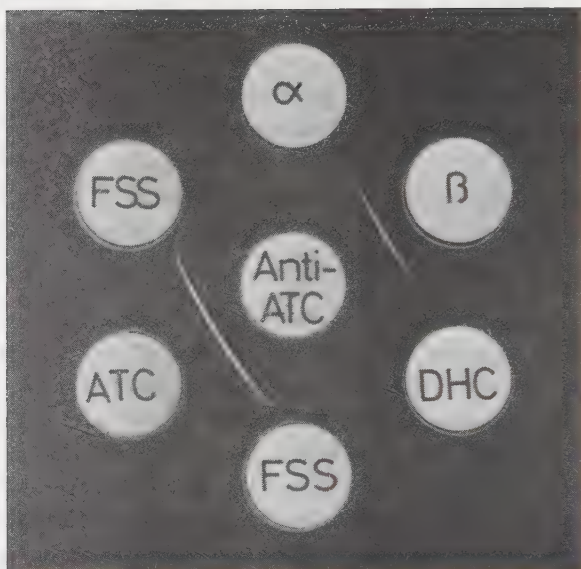


Abb. 41 : Doppeldiffusion nach Ouchterlony (80)
In die Löcher wurden 60 µl Proteinlösung mit
je 30 µg α, β, DHC, FSS und ATC zugegeben. Im
mittleren Loch befand sich 1,5 mg Anti-ATC-IgG

Die Anti-ATC-Antikörper präzipitierten nicht mit der Dehydratasekomponente (Abb. 41), jedoch zeigten die Anti-DHC-Antikörper eine deutliche Kreuzreaktion mit der Acetyltransferasekomponente (Abb. 42).

Auf gleiche Weise wurden Antikörper gegen das Acyl Carrier Protein* des Fettsäuresynthetase-Systems aus *Klebsiella aerogenes* gewonnen. Das ACP trägt ebenso 4'-Phosphopantethein als prosthetische Gruppe und ist in seiner Primärstruktur dem *E.coli*-Acyl Carrier Protein nahe verwandt(83). Der ACP-Antikörper bildete im Ouchterlony Diffusionsversuch keine Präzipitation gegen den Hefekomplex und den getrennten Untereinheiten, sondern nur gegen das spezifische Antigen aus *Klebsiella aerogenes*.

*
Herrn Dr. E. Bayer, Technische Universität München, bin ich für die Überlassung von ACP aus *K.aerogenes* zu großem Dank verpflichtet.

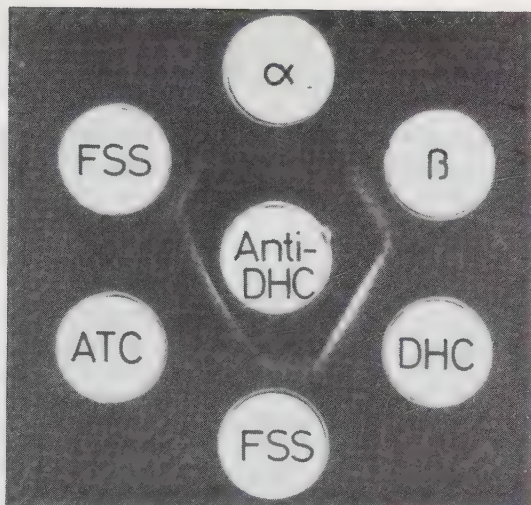


Abb. 42: Doppeldiffusion nach Ouchterlony (80)
In die Löcher wurden 60 μ l Proteinlösung mit je 30 μ g α , β , DHC, FSS und ATC zugegeben. In der Mitte befand sich 2,4 mg Anti-DHC-IgG (Anti-DHC)

Die Anti-DHC-Antikörper zeigten mit ATC und DHC als Nachbar von FSS Spornbildung (Abb. 42). Dies deutet an, daß die Lösung mit nativer FSS mehr antigene Determinanten besaß als,

- 1) die ATC-Lösung
- 2) die DHC-Lösung

Der 1. Fall erscheint plausibel, im 2. Fall können kleine Mengen der denaturierten β -Kette in der FSS-Lösung zu mehr antigenen Determinanten geführt haben, als in der nativen "Domäne" des Dehydrataseteilenzym vorhanden ist.

Die Spornbildung von Anti-DHC-IgG mit DHC und der β -Kette als Nachbar wird ebenfalls auf denaturierte β -Ketten zurückgeführt.

Da die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente gemeinsame antigene Determinanten besaßen (Abb. 42), und ein kleineres Acetyltransferasebruchstück (MG: 4×10^4) während der ATC- und der DHC-Anreicherung identifiziert werden konnte (Abb. 43), wird angenommen, daß die Acetyltransferase- und

die Dehydratasekomponente durch eine überlappende proteolytische Spaltung der benachbarten Teilenzyme entstanden sind (Abb. 44).

Die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente sind beide in der Hauptproteinbande des Proteingipfels III des SDS-Gels (Abb. 43) lokalisiert.

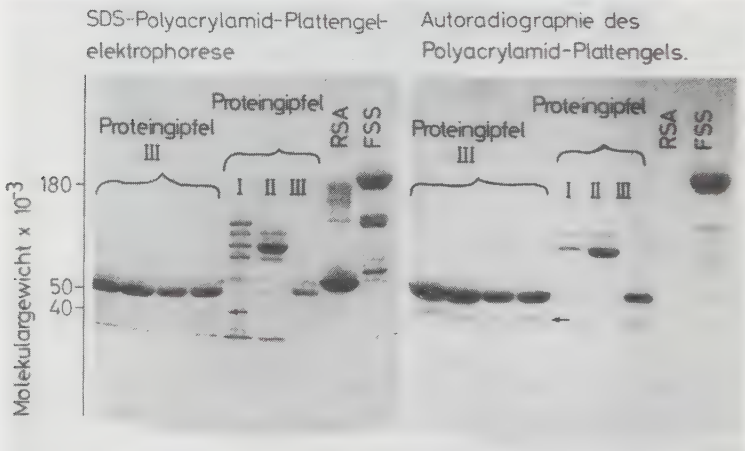


Abb. 43: Identifizierung eines kleineren Acetyltransferasebruchstücks (mit Pfeil gekennzeichnet) nach Auftrennung des Elastasespaltgemisches (Ultragelschritt 1) durch SDS-Gelelektrophorese der mit 1-[¹⁴C]-Acetyl-CoA beladenen Proteingipfel und anschließender Autoradiographie

DTNB Vorinkubation: je 0,4 mg FSS, RSA, Proteingipfel I, II und III des 1. Ultragelschrittes, 1 mM DTNB, 30 min, 25°C, 0,1 M Tris/HCl pH 7,5. Zugabe von je 60 n Mol 1-¹⁴C-Acetyl-CoA (44,1 µ Ci/µ Mol) 8 Min, 0° C.

Aufgetragen von rechts nach links:

35 µg FSS, 45 µg RSA, 10 µg Fr III, 30 µg Fr II, 35 µg Fr. I, 2x15 µg Fr III 2x30 µg Fr III.

Nach Elektrophorese und Anfärbung des Gels, Autoradiographie des Gels nach Bonner und Laskey (68).

Die Proteinbande des kleineren Acetyltransferasebruchstücks in Abbildung 43 kann als identisch mit dem niedermolekularen Anteil des Proteingipfels II nach dem Hydroxylapatitschritt (Seite 37 Abb. 22) angesehen werden.

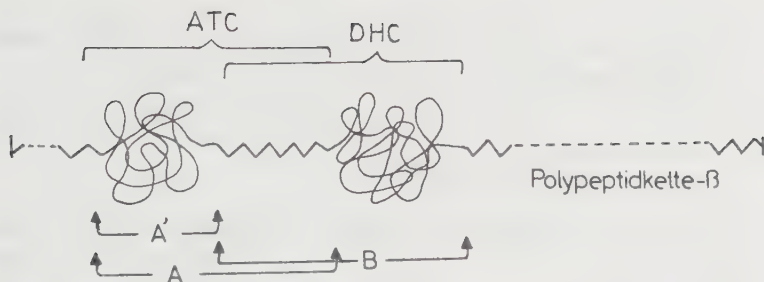


Abb. 44: Hypothetische Angriffsorte der Elastase auf die multifunktionelle Polypeptidkette β der Hefe-FSS. Es entstehen die Proteolyseprodukte A (ATC) und B (DHC) mit gemeinsamen antigenen Determinanten (Bereich identischer Aminosäuresequenzen), sowie A' (kleineres Acetyltransferasebruchstück). Ein kleineres Dehydratasebruchstück ließ sich nicht nachweisen.

6.1.1.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Nach den immunologischen Untersuchungen der Antikörper gegen die beiden isolierten Enzymkomponenten liegen sowohl die Acetyltransferase als auch die Dehydratase auf der Polypeptidkette β (in Übereinstimmung mit den Befunden von Schweizer und Wieland).

Da die beiden isolierten Enzymkomponenten gemeinsame antigene Determinanten besaßen, wird angenommen, daß die Acetyltransferase und die Dehydratase benachbart auf der β -Kette liegen und die beiden Enzymkomponenten durch eine überlappende Proteolyse entstanden sind. Als ein weiterer Hinweis hierauf wird die Identifizierung eines kleineren Acetyltransferasebruchstückes gedeutet.

Die unterbliebene Kreuzreaktion der Anti-ATC-Antikörper läßt sich dadurch erklären, daß entweder der gemeinsame antigene Bereich der beiden Komponenten im nativen Zustand der Dehydratasekomponente für den Antikörper der Acetyltransferasekomponente nicht zugänglich ist oder der überlappende Bereich ist an der Acetyltransferasekomponente nicht antigen wirksam.

Die durch enzymatische Aktivität nachgewiesene, geringfügige Verunreinigung von DHC durch ca. 2 % ATC (Seite 40 Abb. 24) würde ebenfalls die aufgetretene Kreuzreaktion in Abbildung 42 erklären, jedoch sollte man dann eine schwächere Präzipitation erwarten.

6.1.2. Bindungsorte der Antikörper gegen die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente am nativen Enzymkomplex

6.1.2.1. Hemmungsverhalten der gereinigten Antikörper gegenüber nativer Fettsäuresynthetase

Die Abbildung 45 und 46 zeigen das Präzipitationsverhalten der Anti-ATC- und der Anti-DHC-Immunglobuline gegenüber dem nativen Komplex. Bei beiden Präzipitationskurven wurde die Acetyltransferaseaktivität mit zunehmenden Mengen

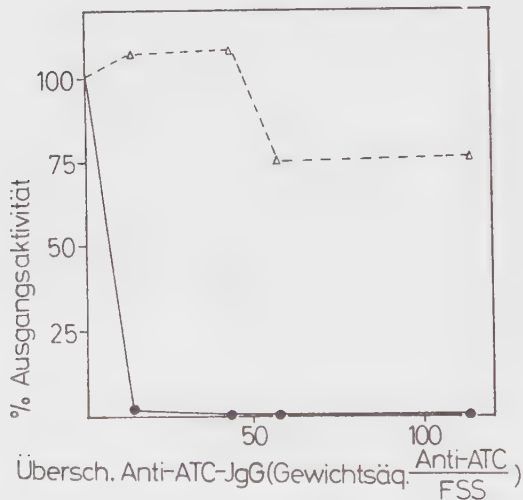


Abb. 45: Präzipitationsverhalten von FSS mit steigenden Mengen an Anti-ATC-IgG.

Je 38 μ g FSS wurden 20 min bei 25°C in 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5 mit steigenden Mengen an Anti-ATC-IgG inkubiert. Nach dem Abstoppen der Inkubation im Eisbad wurden Aliquote vor der Zentrifugation (Δ --- Δ --- Δ) und nach der Zentrifugation ($\bullet$ --- $\bullet$ --- $\bullet$) entnommen und deren Acetyltransferaseaktivität gemessen.

Antikörper vor und nach der Zentrifugation im Überstand gemessen. Im Falle der Anti-DHC-Immunglobuline sahen wir von einer Messung der Dehydrataseaktivität ab, da mit zunehmenden Mengen Antikörper und zunehmender Absorption bei 263 nm die Genauigkeit des optischen Tests stark abnahm.

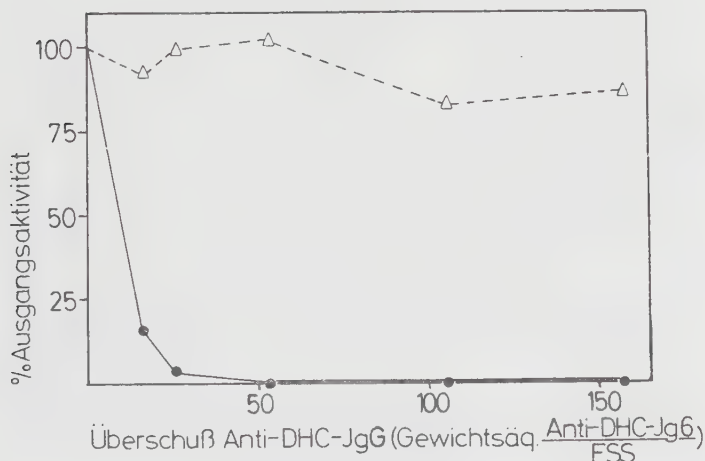


Abb. 46: Präzipitationsverhalten von FSS mit steigenden Mengen an Anti-DHC-IgG.
Je 38 μg FSS wurden 20 min bei 25°C in 0,1 M KPO_4^- -Puffer pH 6,5 mit steigenden Mengen an Anti-DHC-IgG inkubiert. Nach dem Abstoppen der Inkubation im Eisbad wurden Aliquote vor der Zentrifugation (Δ) und nach der Zentrifugation ($\bullet$) entnommen und deren Acetyltransferaseaktivität gemessen.

Der Präzipitationspunkt der Anti-ATC-Antikörper Inkubation lag bei einem 15-fachen Überschuß an Antikörper (w/w), mit dem Anti-DHC-Antikörper lag er bei einem 30-fachen Überschuß (w/w) an Immunglobolin (Abb. 45 und 46).

Um das Hemmverhalten der IgG gegenüber nativer FSS bezüglich der Teilaktivitäten zu studieren, wurden FSS-Proben mit den jeweiligen Mengen IgG inkubiert, die der Überschußmenge des Präzipitationspunktes entsprachen. Als

100%-Werte dienten Inkubationen mit gleichen Mengen an unspezifischem Kaninchen-IgG.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse des Hemmverhaltens der Antikörper gegenüber nativer FSS zusammengefaßt.

Restaktivität nach IgG-Inkubation in % bezogen auf enzymatische Aktivität mit Kontroll-IgG		
Teilaktivität	Anti-ATC-IgG	Anti-DHC-IgG
Acetyltransferase	66	106
Malonyltransferase	61	60
β -Ketoacylreduktase	64	86
Dehydratase	96	96
Enoylreduktase	26	39

Tab. 8: Hemmung der Teilaktivitäten nativer FSS durch Anti-ATC-IgG und Anti-DHC-IgG

Bei einem 150-fachen Überschuß (w/w) an Antikörper gegenüber ATC und DHC wurde mit Anti-ATC-IgG bei ATC eine 60 %ige Hemmung der Acetyltransferase und mit Anti-DHC-IgG bei DHC eine 45 %ige Hemmung der Dehydrataseaktivität gefunden. Die prozentuale Hemmung der Enzymaktivitäten bezieht sich hier auf Ausgangsaktivität ohne unspezifisches Kontroll-IgG.

6.1.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an nativer Fettsäuresynthetase mit den Antikörpern gegen die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente

Durch Inkubation von FSS mit nicht-präzipitierenden Mengen an jeweiligen spezifischen Immunglobulin können nach Wieland (18,21) FSS-IgG-FSS-Komplexe auf Grund der drastischen Erhöhung des Molekulargewichts in einer Rohrzucker-dichtegradienten-Zentrifugation angereichert werden. Vor zwei langsamer wandernden Elutionsgipfeln (monomere IgG- und FSS-Moleküle) erscheint ein schneller wandernder kleiner Gipfel, der den vernetzten FSS-Dimeren entspricht. Die Bindungsorte der Fab-Teile der Antikörper gegen die Untereinheiten α und β konnten am Enzymkomplex nach negativer Anfärbung mit Phosphorwolframsäure im Elektronen-

mikroskop sichtbar gemacht werden.

Unser Ziel war es, nach (21) die Bindungsorte der Antikörper gegen die Acetyltransferase- und die Dehydratasekomponente im Elektronenmikroskop zu lokalisieren.

Zu erwarten war, daß beide Antikörper nicht entlang der Querachse des Ellipsoids, die von einem dichten Proteingürtel der Polypeptidketten α gebildet werden, binden, sondern zwischen Pol und Äquator, dem Bereich der Polypeptidketten β (Abb. 3, Seite 5).

Ein Aggregationsverhalten von FSS-Molekülen ohne Antikörper war auch bei höheren Konzentrationen ($c > 0,1$ mg/ml), als den Vernetzungsbedingungen, nicht zu erkennen (Abb. 47)*
Ausgewertet wurden nur FSS-IgG-FSS Komplexe, bei denen das vernetzende IgG-Molekül deutlich zu sehen war.

Man erkennt, daß die IgG-Moleküle sowohl gegen die Acetyltransferasekomponente (Abb. 48), als auch gegen die Dehydratasekomponente (Abb. 49) in der Nähe der Pole des Hefekomplexes binden.

*Herr Dr. E. Siess, Forschergruppe Diabetes, München hat die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Lokalisierung der Antikörperbindungsstellen angefertigt. Ich bin ihm dafür zu großem Dank verpflichtet.



Abb. 47: Elektronenmikroskopische Aufnahme nativer FSS.
Negative Anfärbung mit Phosphowolframsäure. Ver-
größerung ca. $\times 240\,000$

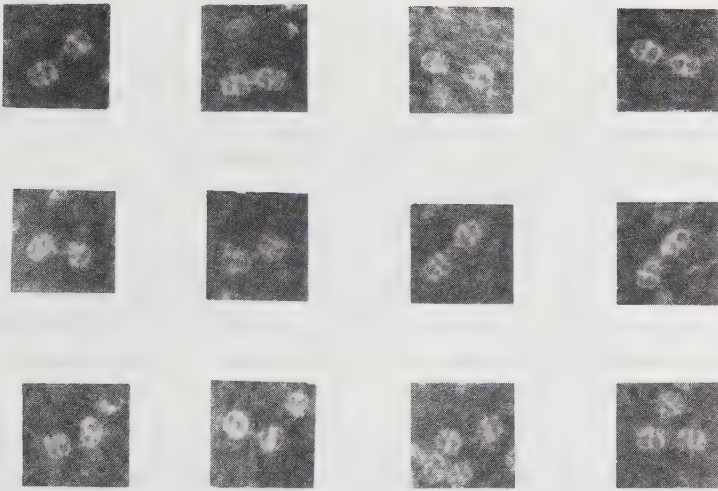


Abb. 48: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von schneller wanderndem Material nach (21) aus der Inkubation FSS + Anti-ATC-IgG. Vergrößerung ca. $\times 240\ 000$. Auswahl von FSS-Dimeren mit sichtbaren Anti-ATC-IgG-Brücken.

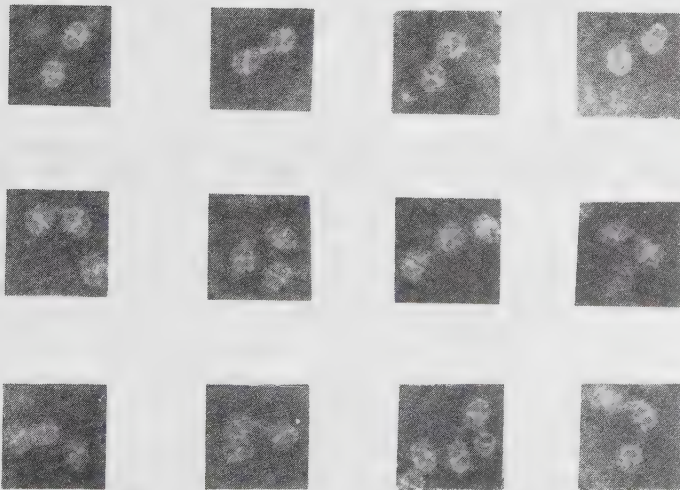


Abb. 49: Elektronenmikroskopische Aufnahme von schneller wanderndem Material nach (21) aus der Inkubation von FSS + Anti-DHC-IgG. Vergrößerung ca. $\times 240\ 000$. Auswahl von FSS-Dimeren mit sichtbaren Anti-DHC-IgG-Brücken.

6.1.2.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die gegen die beiden Enzymkomponenten gewonnenen Antikörper unterschieden sich in ihrem Hemmverhalten:

Die Acetyltransferaseaktivität der nativen FSS wurde nur vom Anti-ATC-Antikörper partiell gehemmt.

Die Dehydrataseaktivität des Enzymkomplexes wurde weder von Anti-ATC-IgG noch von Anti-DHC-IgG partiell gehemmt.

Anti-DHC-IgG inhibierte jedoch partiell die Dehydrataseaktivität von DHC ebenso wie Anti-ATC-IgG die Enzymaktivität von ATC partiell hemmte.

Im Elektronenmikroskop waren die Bindungsorte von Anti-ATC-IgG und Anti-DHC-IgG am FSS-Komplex nicht zu unterscheiden (Abb. 48 und 49). Es zeigten sich nach negativer Anfärbung im Elektronenmikroskop drei Arten von IgG-verbrückten FSS-Dimeren:

1. Vernetzung von Polecke (E) zu Polecke (E) mit langen IgG-Brücken (Abb. 50a)
2. Vernetzung von Polecke (E) zu Polspitze (S) mit mittellangen IgG-Brücken (Abb. 50b)
3. Vernetzung von Polspitze (S) zu Polspitze (S) mit kurzen IgG-Brücken (Abb. 50c)

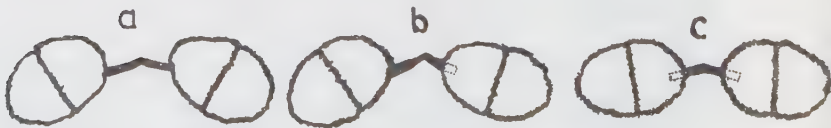


Abb. 50: IgG-verbrückte FSS-Dimere im Elektronenmikroskop. Die nicht sichtbaren, von den FSS-Molekülen abgedeckten Bereiche der IgG-Brücken (b und c) sind gestrichelt gezeichnet.

Die Verkürzung der sichtbaren IgG-Brücken (2. und 3. Vernetzungsart) wird dahingehend interpretiert, daß die dem Bindungsort nahen Bereiche des Antikörpers vom FSS-Molekül im Bild abgedeckt werden. Es wird angenommen, daß nur Vernetzungen über die Polecken des Ellipsoids stattgefunden haben, die sich auf Grund unterschiedlicher Projektionen der

FSS-Dimeren im Elektronenmikroskop verschieden darstellten. Demzufolge liegen die Acetyltransferase und zumindest das Verbindungsglied zwischen dem Acetyltransferase- und dem Dehydrataseenzym (Kreuzreaktion) im Elektronenmikroskop nicht unterscheidbar auf gleicher Höhe der Polecken des Ellipsoids. Das Dehydrataseenzym scheint im Enzymkomplex für die Anti-DHC-IgG-Moleküle schwerer zugänglich zu sein als im Zustand der Dehydratasekomponente, da nur das DHC-Molekül vom Antikörper partiell gehemmt wurde.

6.2. Lokalisierung der Transferasen auf der Polypeptidkette β

Die Malonyltransferase konnte bisher auf Grund der genetischen Arbeiten von Schweizer (15), der proteinchemischen Arbeiten von Engeser und Wieland (67), und durch Messung enzymatischer Aktivitäten der isolierten Untereinheiten (19) eindeutig der β -Kette zugeordnet werden.

Um Einblick über die Lage der Acetyltransferase und der Malonyltransferase auf der Polypeptidkette β zu gewinnen, wurden die beiden Transferaseaktivitäten nach Ultrogelschritt 1 der ATC- und DHC-Anreicherung im Proteinbandenmuster der angefärbten SDS-Polyacrylamidgele durch radioaktive Markierung lokalisiert (Abb. 51).

Nach der Auftrennung des Elastasespaltansatzes durch Gelfiltration in die Proteingipfel I, II und III, wurden die isolierten Proteingipfel, native FSS und Rinderserumalbumin mit 1-[^{14}C]-Acetyl-CoA nach Engeser (67) unter den Bedingungen der Acetyltransferasebeladung inkubiert. Dabei wurde neben der Acetyltransferasekomponente mit ca. 17. % Dehydratasekomponente in Proteingipfel III ein größeres Polypeptidfragment β' (in Abb. 51 mit Pfeil gekennzeichnet) in Proteingipfel II mit 1-[^{14}C]-Acetatbindungsstelle identifiziert.

Die gleichen Proteinproben wurden nach Engeser und Wieland (67) mit 1,3-[^{14}C]-Malonyl-CoA beladen. Es zeigte sich, daß das gleiche Polypeptidfragment β' ebenso radioaktives Malonat zu binden vermag (Abb. 51 IIa und b). Nach Engeser und Wieland (20, 67) werden die Malonyl- und die Acetyltransferase nach vorheriger Blockierung der zentralen und peripheren SH-Gruppen

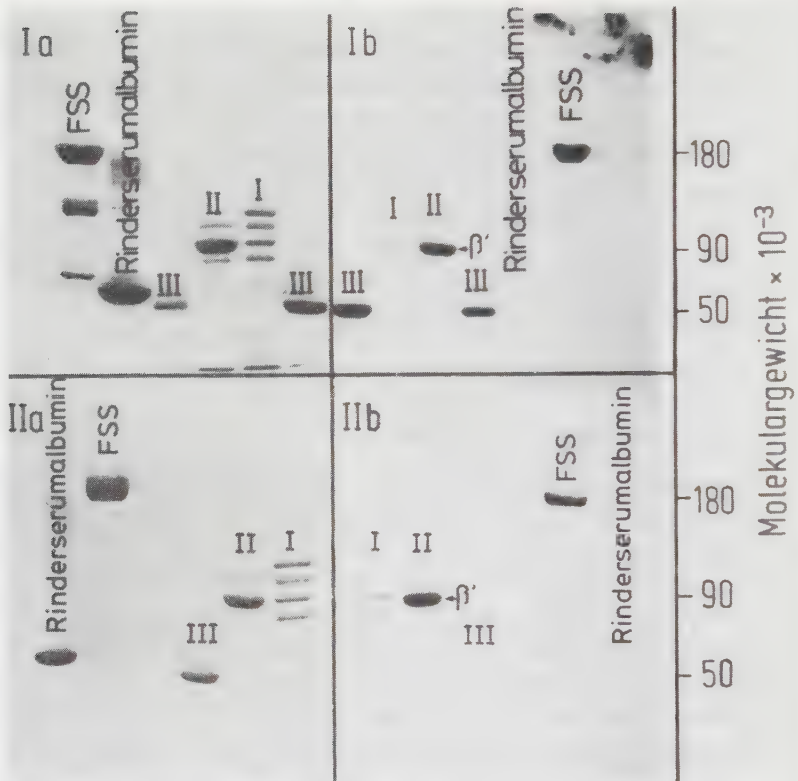


Abb. 51: Lokalisierung der Acetat- und Malonatbindungsstellen des Elastasespaltansatzes nach Gelfiltration
FSS, RSA und die Proteingipfel I, II und III des Ultragelschrittes 1 wurden nach 1-[14 C]-Acetyl-CoA-Beladung (Ia) und nach 1,3-[14 C]-Malonyl-CoA-Beladung (IIa) im SDS-Gel elektrophoretisiert. Nach der Anfärbung der Gele (Ia und IIa) wurden die Acetat-(Ib) und die Malonatbindungsstellen (IIb) durch Autoradiographie der Gele im Proteinbandenmuster lokalisiert (Ib und IIb).

- Ia : 1-[14 C]-Acetyl-CoA Beladung und Elektrophorese nach Abschnitt 6.1.1.3. (Abb. 43).
- IIa : 1,3-[14 C]-Malonyl-CoA Beladung nach Inkubation von je 0,9 mg (45mg/ml) FSS, RSA und je 0,2mg (10mg/ml) Proteingipfel I, II und III der Ultragelchromatographie mit je 6 nMol (0,38 μ Mol/ml) 14 C-Mal CoA (43 μ Ci/ μ Mol) 30 Min bei $^{\circ}$ C in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0. Vorherige DTNB-Inkubation der Proteinlösungen 0,1 M Tris/HCl pH 7, 1 mM DTNB bei 25 $^{\circ}$ C, 30 Min. Die Beladungen wurden gestoppt durch 3-faches Verdünnen mit Lämmli Spaltpuffer (91).
- Aufgetragen wurden je 80 μ g RSA und FSS, je 17 μ g Proteingipfel III und je 34 μ g Proteingipfel II und I in je 50 μ l.
- Ib : Autoradiographie des nach Ia beladenen Gels.
- IIb : Autoradiographie des nach IIa beladenen Gels.

mit DTNB durch ihre natürlichen Substrate markiert. Tatsächlich zeigte sich in der Hauptbande des Proteingipfels III (ATC und DHC) keine Malonyl-CoA-Bindungsstelle. Nach der Molekulargewichtsbestimmung durch Auftragung der elektrophoretischen Beweglichkeit gegen den Logarithmus der Molekulargewichte, handelt es sich bei der β' -Bande des Proteingipfels II um ein auf die Hälfte verkürztes Fragment der β -Kette mit einem Molekulargewicht um 90×10^3 Dalton. Nach den Befunden der Autoradiographie der SDS-Gele besitzt die Acetyltransferasekomponente und die Dehydratasekomponente des Hefe-Komplexes keine Malonatbindungsstelle, das heißt die Acetyltransferase und die Malonyltransferase müssen als autonome Teilenzyme getrennt auf dem Bruchstück mit MG 90 000 liegen.

Nimmt man an, daß die fünf Aktivitäten der Polypeptidkette β in Form von vier Domänen als Träger der reaktiven Zentren (reaktive Zentren der Malonyltransferase und der Palmityltransferase sind identisch) gleichmäßig nebeneinander auf der β -Kette angeordnet sind, so sollte die Malonyltransferase neben der Acetyltransferase auf der β -Kette lokalisiert sein.

6.3. Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie

Es wurde eine Untersuchung der Hefe-Fettsäuresynthetase mit Hilfe der Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie (STEM) durchgeführt.* Ihr Ergebnis (Abb. 52) bestätigt die wesentlichen Strukturmerkmale des von Lynen und Wieland (21) vorgeschlagenen Modells.

*Herrn Dr. U. Jakubowski, MPI für Biochemie, Martinsried, bin ich für die Durchführung der Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie zu großem Dank verpflichtet.

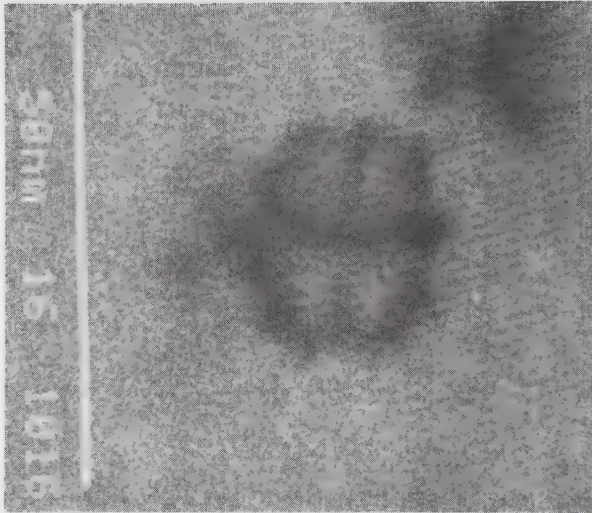


Abb. 52: Elektronenmikroskopische Aufnahme nativer FSS mit STEM
Negative Anfärbung mit Uranylacetat, Vergrößerung
ca. $\times 1,6 \times 10^5$.

6.4. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Struktur der Fettsäuresynthetase.

Durch limitierte Proteolyse der nativen Fettsäuresynthetase wurden die Enzyme der α -Kette von zwölf verschiedenen Proteasen wesentlich schneller inaktiviert als die Teilaktivitäten der β -Kette.

Während die Aktivitäten der Teilenzyme der α -Kette anscheinend auf die Ausbildung von Quartärstrukturen angewiesen sind, konnte durch Isolation monomer vorliegender enzymatisch aktiver Proteinfragmente der β -Kette gezeigt werden, daß hier die Teilenzyme der Acetyltransferase und der Dehydratase in Form unabhängiger Domänen vorliegen.

Aufgrund der gegen die Enzymkomponenten gewonnenen Antikörper (Kreuzreaktion von Anti-DHC-IgG mit ATC) wird angenommen, daß das Dehydrataseenzym in der Primärstruktur der β -Kette neben dem Acetyltransferaseenzym liegt. Es konnte ein um die

Hälfte verkürztes Bruchstück β' (MG: 90 000) der β -Kette mit Acetat- und Malonatbindungsstelle (Abb. 51) identifiziert werden. Folglich müßte bei einer gleichmäßigen Verteilung von vier unabhängigen Domänen auf der multifunktionellen Polypeptidkette β die Malonyltransferase in der Primärstruktur neben der Acetyltransferase lokalisiert sein. Auf Grund dieser Annahme würden sich für die Verteilung der β -Teilenzyme auf der Primärstruktur zwei Möglichkeiten ergeben (Abb. 53).

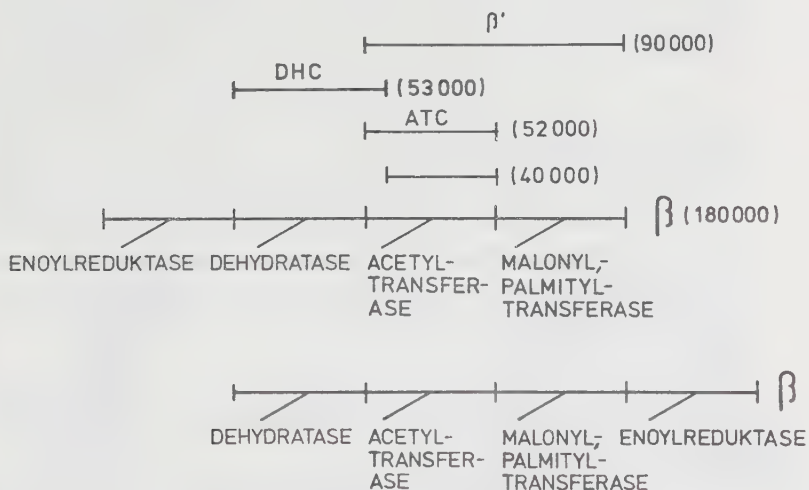


Abb. 53 : Lokalisierungsmöglichkeiten der Teilaktivitäten auf der Polypeptidkette β unter der Annahme der Gleichverteilung von vier Domänen. In Klammern: Molekulargewichte der Polypeptide . Polypeptide mit Acetatbindungsstelle (180 000, 90 000, 52 000, 40 000) und mit Malonatbindungsstelle (180 000, 90 000).

Die deutliche Verschiebung des Substratsättigungsbereiches der Modellsubstratabhängigkeit für das Dehydrataseenzym vom nativen FSS-Komplex zur Dehydratasekomponente zu niederen Substratkonzentrationen wird als Hinweis gedeutet, daß sich das reaktive Zentrum der Dehydratase im Inneren des ellipsoiden Hohlkörpers (23) der Fettsäuresynthetase befindet, und

das Modellsubstrat leichter an das reaktive Zentrum des monomeren Bruchstücks gelangt, als in das Innere des Hohlkörpers diffundiert.

Diese Deutung stimmt mit den experimentellen Befunden der Inhibierungsstudien mit spezifischen Antikörpern an nativer FSS überein, da der Anti-DHC-Antikörper die Dehydrataseaktivität am Komplex nicht zu hemmen vermag.

Die Bindungsorte der Antikörper gegen das Acetyltransferase- und gegen das Dehydratasebruchstück ließen sich im Elektronenmikroskop nicht unterscheiden. Die IgG-Moleküle banden im Elektronenmikroskop an den Polecken des ellipsoiden Enzymkomplexes. Aufgrund der Kreuzreaktion der Anti-DHC-Antikörper mit ATC, und dem Befund, daß nur der Anti-ATC-Antikörper das Acetyltransferaseenzym im Komplex partiell hemmt, wurde folgendes angenommen:

- a) Die Anti-ATC-IgG-Moleküle binden am Enzymkomplex an dem Acetyltransferaseenzym.
- b) Die Anti-DHC-IgG-Moleküle binden am Enzymkomplex an dem Verbindungsglied zwischen Acetyltransferase und Dehydratase auf der Polypeptidkette β .

Mit Hilfe der gewonnenen experimentellen Daten konnte das bisherige α_6 - β_6 -Strukturmodell (21) weiter verfeinert werden (Abb. 54).

Bei der Verteilung der Teilaktivitäten der β -Kette im dreidimensionalen Modell wurden folgende hypothetische Annahmen mit berücksichtigt:

1. Die Acetyltransferase und die Malonyltransferase sind in der äußeren Proteinhülle des Hohlkörpers lokalisiert, da sie die Säurereste von freien Thioestern auf das Acyl Carrier Protein transportieren müssen.
2. Das Acyl-Carrier-Protein der α -Kette befindet sich im Hohlraum des Ellipsoids, da
 - a) das ACP bzw. der gebundene Acylrest am ACP (Länge der prosthetischen Gruppe: 20 Å) mit der Acetyltransferase und der Dehydratase im Polbereich des Ellipsoids

in Kontakt treten muß. (Abstand Bauchbinde-Antikörperbindungsstellen: 90 Å)

b) die Antikörper gegen die α -Kette nur an der Bauchbinde des Ellipsoids binden (21).

3. Die Dehydratase (Konzentrationserniedrigung des Substratsättigungsbereiches für DHC, keine Hemmung am FSS-Komplex durch Anti-DHC-IgG) und die Enoylreduktase liegen im Inneren des Hohlkörpers, da ihre natürlichen Substrate am Acyl Carrier Protein kovalent gebunden sind.

Die hexagonale Basisplatte der sechs α -Untereinheiten, deren Existenz durch Untersuchungen im Arbeitskreis Hoppe (24) gesichert scheint, wurde vom bisherigen Modell (Abb. 4) unverändert übernommen, da Daten über die Lage der Teilenzyme der α -Kette nicht vorliegen.

Experimente an der Fettsäuresynthetase aus Hefe, die zur Unterscheidung von Teilenzymen an der Proteinhülle und im Inneren des Ellipsoids führen könnten, sind zur Prüfung des vorgeschlagenen Modells vorgesehen.

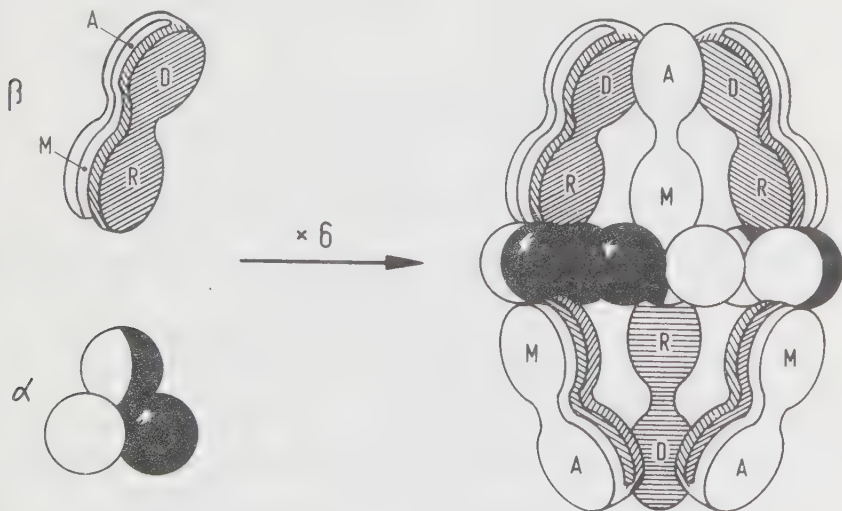


Abb. 54: Schematisches Modell des FSS-Komplexes mit Verteilung der Teilenzyme der Untereinheit β auf 4 Domänen (Scheiben). Die Grundstruktur des α_6 - β_6 -Komplexes wurde von Lynen und Wieland (21) übernommen. A=Acetyltransferase, D=Dehydratase, M=Malonyl- und Palmityltransferase, R=Enoylreduktase. Die Verteilung von M und R im Modell ist hypothetisch. Die schraffierten Scheiben sind in das Innere des Hohlkörpers gerichtet, die weißen Scheiben sind nach außen gerichtet.

7. Experimenteller Teil

7.1. Allgemeines

7.1.1. Verwendete Geräte

Photometer "Eppendorf" mit Kompensationsschreiber G 6511
Spektralphotometer PM6 und DMR 21, Zeiß

Mark II, Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago,
Division, Searle

Präparative Ultrazentrifugen, L-3-50, L-2-65B, L-5-65,
L-3-40

Analytische Ultrazentrifuge Beckmann Modell E mit Scanner
Optik, Rotor AnH, 6-Channel Mittelstück

Tischzentrifuge Labofuge I, Heraeus

Tischzentrifuge Eppendorf 3200 u. 5412, Metheler Hinz

Tischzentrifuge Christ Superspeed Junior

Präparative Zentrifugen Sorvall RC-2B, G50K, WKF.
8 x 1350 Stock

Fraktionskollektoren Ultrorac, Redirac, LKB mit UV
Monitoren ISCO und Uvicord III

Säulenchromatographiezubehör, Serva und Eigenbau
MPI für Biochemie, Martinsried

Fertigsäulen Kieselgel 60 Größe A, Merck

Schlauchpumpen, LKB

Platten- und Stangengelelektrophorese-Apparaturen, Eigenbau
MPI für Biochemie, Martinsried

Flackbettisofokussier-Apparatur Multiphor LKB

Speisegerät Camag und LKB

Isofokussiersäule, LKB (110 ml)

Rotationsverdampfer, Büchi

Zellhomogenisator, Manton-Gaulin, Homogenisator SG-zauber-
stab

Trockenschrank Heraeus

Gefriertrocknungsanlage WKF LO5

pH-Meter, Metrohm Modell E-500 mit Glaselektroden, Ingold
Leitfähigkeitsmeßgerät, Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
Gradientenformgerät Ultrograd, LKB

Waagen Mettler Pl210, H35 und H54
Rührmotoren Colora
Wasserbäder, Labora und Haake
Pipetten, Eppendorf, Pipetman und Variopet
Kapillarpipetten, Labor und Assistant
Microcaps, Drummond
Mikroliterspritzen, Hamilton
Reaktionsgefäße, Eppendorf
Disk-Dialysekammern mit Magnethalter (25-500 µl), Schütt
Hochvakuumanlage, Otto Fritz GmbH, Hofheim mit Difussions-
und Rotationspumpe, Edwards
Whirlmix Cenco
Kodak X-Omatic Kasette

7.1.2. Materialien

Handelsmaterialien. Enzyme und Coenzyme, sofern nicht eigens
aufgeführt (Boehringer, Mannheim); Serumalbumin vom Rind
und Agarose (Behringwerke, Marburg). DTT (Calbiochem, San
Diego); DTNB, Dansylchlorid (Fluka) Dansylaminosäure-
Kollektion, Chymotrypsin, Elastase, Thermolysin, Dowex,
Chemikalien für die Polyacrylamidgelelektrophorese und
Pantethin (Serva, Heidelberg)
Ampholine und Ultrogel AcA44 (LKB, Stockholm)
Guanidin-HCl, Ficin, Pronase, Kaninchen-JgG (Sigma, München)
Biogel HT, SDS-Page Low-Molecular-Weight-Standards (Bio-Rad)
verschiedene Sephadextypen (Pharmacia, Uppsala)
Al₂O₃ basisch (ICN-Woelm, Eschwege)
Dünnschichtplatten Kieselgel F₂₅₄, Dünnschicht-Alufolien
Kieselgel F₂₅₄ (Merck, Darmstadt)
Mikropolyamidfolien A 1700 (Schleicher Schütt, Dassel)
komplettes und inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Difco,
Detroit)
2-Mercaptoäthanol (Roth, Karlsruhe)
Radiochemikalien (The Radiochemical Centre, Amerhsam)
Dialyseschläuche (Union Carbide, Chicago)
Stickstoff nachgereinigt (Linde, München)
PPO (Packard, Frankfurt)
Protease S. aureus V8 (Miles, Slough)

Nonidet P40, Thiolessigsäure (Fluka, Neu-Ulm)
Unisolve (Koch-Light, Colnbrook-Buchs)
Röntgenfilme X-O-mat (Kodak, Rochester)
Entwickler, Roentgen, Fixierer Superfix (Tetenal, Hamburg)
THF wurde mit LiAlH_4 am Rückfluß gekocht und anschließend destilliert

Bierhefe (Löwenbräu, München)

Freundlicherweise überlassen wurden mir folgende Enzyme und Chemikalien:

α - und β -Untereinheiten der Hefe-Fettsäuresynthetase von Dr. F. Wieland (Universität Regensburg), Pankreatischer Trypsininhibitor Trasylol[®] von Bayer Leverkusen, Protease aus der Unterkieferdrüse der Maus (Boehringer, Tutzing)

Acyl-Carrier-Protein von der Fettsäuresynthetase in K. aerogenes von Dipl.Chem. Ernst Bayer (Technische Universität München)

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl CoA von Dr. R. Seyffert

Folgende Substanzen wurden nach den angegebenen Literaturvorschriften synthetisiert:

Acetyl-CoA (84), Malonyl-CoA (85), Acetylpantethein in Anlehnung an (85) aus Essigsäureanhydrid und Pantethein.

Calciumphosphatgel (86), N-Acetylcysteamin (87)

Pantethein in Anlehnung an (88) aus Pantethein durch Reduktion mit NaBH_4 und Extraktion mit Methylenchlorid.

D,L- β -Hydroxyfettsäuren (30), Thioester der D,L- β -Hydroxyfettsäuren (31) modifiziert nach (32).

Alle nicht erwähnten Chemikalien wurden in der höchsten angebotenen Reinheit bezogen von Merck (Darmstadt).

7.1.3. Allgemeine analytische Methoden

7.1.3.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 280 nm und 260 nm nach Warburg und Christian (70), oder alternativ bei Konzentrationen unter 0,05 mg/ml nach Bradford (69) im Mikrotest: 5-50 μg Protein ad 0,1 ml Puffer

und 1 ml Proteinreagenz (100mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 50 ml 96 %igem Äthanol (v/v) und 100 ml 85 %iger Phosphorsäure (v/v) ad 1 Liter H₂O frisch angesetzt). Messung bei 595 nm 5 Min. nach Zugabe von Proteinreagenz in 1 ml Plastikkuvetten. Eine Eichkurve wurde unter Verwendung des gleichen Proteinmaterials aus Verdünnungen bekannter Proteinkonzentrationen (n. Warburg u. Christian) angefertigt.

7.1.3.2. Radioaktivitätsmessungen

Die 1-¹⁴C-Bestimmungen der wässrigen Lösungen (ad 500 µl) wurden in Flüssigkeitszintillationszählern mit Unisolve (10 ml) durchgeführt (Mark II). Die Zählausbeute bestimmten wir mit dem externen Standard ¹⁴C-n-Hexadecan, sie lag zwischen 87-92 %.

7.1.3.3. Autoradiographie der Polyacrylamidgele

Das zu untersuchende angefärbte und entfärbte Polyacrylamidgel wurde mit radioaktiver Tinte (1-¹⁴C-Malonsäure gemischt mit Dextranblaulösung) an mehreren Stellen eindeutig markiert (wichtig für die spätere Lokalisierung). Das Gel entwässerten wir zweimal mit DMSO, tränkten es in PPO-Lösung (20 % PPO in DMSO) und wässerten nach Bonner und Laskey (68). Anschließend wurde das Gel auf Whatmann 3 MM Papier gelegt, im Vakuum getrocknet und in völliger Dunkelheit mit einem Röntgenfilm in einer Kodak X-Omatic Kassette 20-22 h bei -70° C belichtet. Entwicklung und Fixierung erfolgte nach den Vorschriften der Chemikalienhersteller.

7.1.3.4. Gehaltsbestimmung von Thioestern und Thiolen

Acetyl-Co enzymatisch nach Buckel und Eggerer (66), Malonyl-CoA im optischen Test (89), Pantethein- und N-Acetylcysteaminthioester durch Messung der Thioesterabsorption bei 233 nm (90), für die kinetischen Messungen am dehy-

dratisierenden Teilenzym der FSS wurden die Thioester-gehaltsbestimmungen durch Thiolbestimmung nach Verseifung des Thioesters mit DTNB (72), modifiziert nach (32), bestimmt. Verseifung der Thioester: Die Thioesterlösung wurde mit 0,2 ml 1 N NaOH versetzt und auf 0,5 ml mit H_2O verdünnt. Nach 30 Min. wurden 0,2 ml 1 N HCl zugegeben und mit 0,3 ml 0,1 M KPO_4 pH 7,0 auf 1 ml aufgefüllt.

7.1.3.5. Analytische Gelelektrophoresen

a) Proteinproben (5-20 μg) im nativen Zustand (native Disk-Gelelektrophorese) wurden ohne Obergel auf die Trenngele mit Bromphenolblau im System 1 nach Maurer (59) aufgesetzt. Die zylindrischen Gele (0,5 x 6 cm) wurden mit 250-350 V und 2-3 mA im Kühlraum bei 4°C elektrophoretisiert. Die Acrylamidkonzentration betrug 7,5 %.

b) SDS-Gelelektrophoresen erfolgten nach Lämmler (91) in Polyacrylamid-Flachgelen mit linearem Konzentrationsgradienten an Acrylamid 5-15 % (w/w), darauf befand sich ein 3,4 %iges Taschengel. Es wurde mit einer stabilisierten Spannung von 150-250 V im Kühlraum bei 4°C gearbeitet.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit einer Coomassie G 250-Lösung, in einer wässrigen Lösung mit 7,5 % Eisessig (v/v), und 10 % Methanol (v/v) wurden die Gele entfärbt.

7.1.4. Anreicherung der Fettsäuresynthetase und Messung der enzymatischen Aktivitäten

7.1.4.1. Anreicherung

Die Anreicherung der FSS erfolgte aus Bierhefe der Löwenbrauerei, München, die direkt aus dem Brauprozess stammte. Die Anreicherung wurde durchgeführt nach Lynen (92), modifiziert nach Oesterhelt (93) und Schreckenbach (94). Vor dem Aufschluß der Zellen wurde den Hefesuspensionen

der Serin-Proteasen-Inhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) bis zu einer Konzentration von 1 g/l zugegeben. Aus 10 kg abzentrifugierter, feuchter Bierhefe wurden 1,5-3 g Enzym mit spezifischen Aktivitäten zwischen 1500-3200 mE/mg gewonnen.

7.1.4.2. Messung der enzymatischen Aktivitäten

Als Maß für die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen wurde nMol Substratumsatz pro Minute (mE) oder Extinktionsänderung pro Minute gewählt. Beide Angaben beziehen sich auf 1 mg Enzym (FSS, ATC oder DHC).

a) Messung der Gesamtsynthese.

In 1 ml Küvettenvolumen waren enthalten:

100 μMol KPO_4 pH 6,5, 0,2 mg RSA, 0,08 μMol Acetyl-CoA, 0,2 μMol NADPH, 4-10 μg FSS.

Nach 2 Min Blindlauf Start mit 0,1 μMol Malonyl-CoA.

Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei 334 nm, 25° C
 ϵ_{NADPH} bei 334 nm = $6,18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (95).

1 Einheit (E) ist die Menge FSS, die unter Testbedingungen 2 μMol NADPH pro Minute umsetzt.

b) Messung der Acetyltransferase.

Die enzymatische Aktivität wurde im optischen Test nach Weithmann (13) mit Malatdehydrogenase (MDH) und Citratsynthase (CS) bestimmt. Der Test erfolgte mit der vierfachen Menge an Acetylpantethein und der doppelten Menge an Coenzym A gegenüber (13).

1 ml Küvettenvolumen enthielten:

100 μMol Tris/HCl pH 8,1, 10 μMol R-S-Malat, 3 μMol NAD^+ , 2,5 μMol Acetylpantethein, 11 E MDH, 4,4 E CS, 0,7 μMol CoA-SH.

Nach 3 Minuten Blindlauf erfolgte der Start mit Enzym.

Meßgröße ist die optische Dichte des entstehenden NADH.

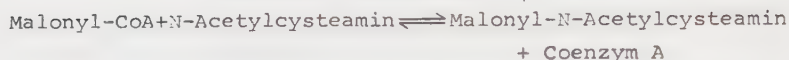
Für die Errechnung der Umsatzzahl von Acetylpantethein, muß die Geschwindigkeit der Hilfsreaktionen mit dem Korrekturfaktor $f = 2,6$ multipliziert werden (66).

c) Messung der Malonyltransferase

Der optische Test erfolgte nach Weithmann (13) mit Phosphotransacetylase (PTA) durch Umsetzung von gebildetem Coenzym A zu Acetyl-CoA (Gl.: 9)

Gl.: 9

Malonyltransferase



Phosphotransacetylase



Es wurde gegenüber (13) mit Enzym gestartet und nicht mit N-Acetylcysteamin.

1 ml Küvettenvolumen im Meßstrahlengang und im Referenzstrahlengang enthielten:

100 μMol Tris/HCl pH 7,5 1 μMol N-Acetylcysteamin, 1 μMol Acetylphosphat, 10E PTA, 0,1 μMol Malonyl-CoA.

Start nach 2 min Blindlauf mit Enzym in der Meßküvette
Meßgröße: Extinktionszunahme bei 233 nm (Acylmercaptanbande), Extinktionskoeffizient $\epsilon_{233} \quad 4,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (90)$.

d) Messung der β -Ketoacetylreduktase

Die Messung wurde nach Ziegenhorn (33) durchgeführt.

1 ml Küvettenvolumen enthielt:

100 μMol KPO_4 pH 6,5, 0,2 μMol NADPH und Enzym. Gestartet wurde nach 3 Minuten Blindlauf mit 5 μMol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin.

Meßgröße: Extinktionsänderung bei 334 nm.

e) Messung der β -Hydroxyacyldehydratase

Der optische Aktivitätstest erfolgte im 2-Küvettensystem mit D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein (Abschnitt 2.7)

1 ml Küvettenvolumen im Meßstrahlengang und im Referenz-

strahlengang enthielten:

200 μMol Tris/HCl pH 7,5, 5 μMol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein. Gestartet wurde nach 2 Min Blindlauf mit Enzym. Meßgröße: Extinktionszunahme, entsprechend der Bildung des Enoylthioesters bei 263 nm (29), mit Extinktionskoeffizient $\epsilon_{263} = 6,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Extinktionsänderung blieb proportional der eingesetzten Enzymmenge zwischen 3 und 30 μg FSS.

f) Messung der Enoylreduktase

Die Aktivität wurde nach (96) mit dem Redoxfarbstoff Dichlorphenolindophenol bei 578 nm gemessen.

1 ml Küvettenvolumen enthielt:

100 μMol KPO_4 pH 6,5, 40 nMol 2,6-Dichlorphenolindophenol, 0,2 μMol NADH.

Nach 3 Min wurde mit Enzym gestartet.

Meßgröße: Extinktionsänderung bei 578 nm, $\epsilon_{578} = 16,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (29). 1 E = Enzymmenge, die 1 μMol Dichlorphenolindophenol pro min reduziert.

g) Messung der Deacylase (Nebenreaktion der Acetyltransferase).

In Anlehnung an (4) erfolgte der optische Test durch Messung des entstehenden freien Coenzym A mit DTNB bei 405 nm nach folgenden Bedingungen:

Inkubation von FSS, bzw. ATC (5-15mg Protein/ml) bei 25° C in 0,1 M KPO_4 pH 6,5, 1 mM DTNB, 20 min.

Nach dem Abstoppen der Inkubation im Eisbad wurde die Extinktionsänderung bei 10° C gemessen. Der Küvettenraum mußte stetig von einem über Calciumchlorid getrockneten Stickstoffstrom durchblasen werden, um das Beschlagen der Küvetten zu verhindern.

Die zwei Meß- und die zwei Referenzküvetten wurden nach folgendem Schema à 1 ml gefüllt:

1 1 μMol DTNB
100 μMol KPO_4 pH 6,5

3 1 μMol DTNB
100 μMol KPO_4 pH 6,5
0,7-2,1 nMol FSS
oder 5-15 nMol ATC

2 1 μMol DTNB
100 μMol KPO_4 pH 6,5
0,7-2,1 nMol FSS
oder 5-15 nMol ATC
0,7-1 μMol AcCoA

Start mit
Acetyl-CoA

4 1 μMol DTNB
100 μMol KPO_4 pH 6,5
0,7-1 μMol AcCoA

Meßstrahl

Referenzstrahl

Gestartet wurde durch gleichzeitige Zugabe von frisch nachgereinigtem Acetyl-Coenzym A (Acetanhydrid) in Küvette 2 und 4.

Die Deacylaseaktivität entsprach dem linearen Verlaufsabschnitt der Extinktionszunahme nach dem Extinktionssprung der Beladung.

7.1.5. Säulenchromatographie

7.1.5.1. Allgemeine Verfahren

Als Säulen dienten entweder am unteren Ende spitz ausgezogene Glasrohre, die mittels einer Glaskugel die Gelmatrix beim Eluieren zurückhielten (Abschnitt 5.4.1.) oder Fertigsäulen von Serva bzw. Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried, die mit Stempeln mit Dichtungsringen zum Probenaufragen und Eluieren versehen waren (Abschnitt 4.). Die Säulenabmessungen sind den entsprechenden Legenden zu entnehmen. Um konstanten Durchfluß während der Chromatographie zu erreichen, wurden regulierbare Pumpen verwendet.

7.1.5.2. Gelfiltration (Abschnitt 4.2 und 5.4.1.)

Vorbereitung des Gels und Durchführung der Chromatographie wurden nach den Vorschriften der Hersteller (104,105) ausgeführt.

7.1.5.3. Chromatographie an Hydroxylapatit (Abschnitt 4.2.3.)

Vorbereitung des Gels, Entfernung der Fines, das Äquilibrieren und Regenerieren der Säulen wurden nach der Vorschrift des Herstellers ausgeführt (106).

7.2. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 2

7.2.1. Synthesen der Modellsubstrate

7.2.1.1. Organisch-präparative Synthesen der D,L- β -Hydroxyacylthioester und S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin.

a) Synthesen der freien Säuren.

D,L- β -Hydroxybuttersäure und Crotonsäure wurden von Merck-Schuchardt erworben, alle anderen D,L- β -Hydroxysäuren wurden nach Reformatzky (30) in einer Modifikation von Stoffel (98) dargestellt.

Bei der Synthese von D,L- β -Hydroxyhexansäure, D,L- β -Hydroxyoctansäure und D,L- β -Hydroxydecansäure wurde der β -Hydroxysäuremethylester vor der Verseifung destilliert. Die D,L- β -Hydroxyhexansäure mußte für die Thioestersynthese als Rohprodukt eingesetzt werden, da alle Kristallisationsversuche in Aceton/Trockeneis wie in Eis/Kochsalz-Kältemischungen mit Essigester/Petroläther als Lösungsmittel nach Vagelos und Mitarbeiter (40) scheiterten. In Tabelle 9 sind die aus Petroläther umkristallisierten β -Hydroxysäuren mit ihren Schmelzpunkten zusammengefaßt.

Zahl der C-Atome der D,L- β -Hydroxy- säuren	gefunde- ner F.p. [$^{\circ}$ C]	Literatur F.p.[$^{\circ}$ C]	umkristallisiert aus
6	-	13 (99)	-
8	34-35	38-38,5 (99)	Petroläther (40-60 $^{\circ}$ C)
10	59	57-58 (32) 56-56,5 (99)	Petroläther (80-110 $^{\circ}$ C)
12	71	70-70,5 (99)	Petroläther (80-110 $^{\circ}$ C)

Tab. 9: Schmelzpunkte (F.p.) der synthetisierten D,L- β -Hydroxysäuren

b) Synthese der Thiole

Die Synthese von N-Acetylcysteamin erfolgte nach (87), Pantethein wurde nach (88) durch Reduktion des Pantethins mit folgenden Abänderungen synthetisiert:

Pantethin wurde mit NaBH_4 reduziert und mit Methylenchlorid aus der durch Gefriertrocknung eingeeengten Lösung extrahiert (Ausbeute 42 %).

c) Synthesen der Thioester

Die Synthesen der D,L- β -Hydroxyacylthioester und Crotonylthioester erfolgten nach (31) in einer Modifikation nach (32) in peroxidfreiem THF als Lösungsmittel, welches am gleichen Tag mit LiAlH_4 unter Rückfluß gekocht und unter Lichtausschluß destilliert wurde.

N-Acetylcysteaminthioester:

Die D,L- β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteaminderivate der Octan-, der Decan- und der Dodecansäure konnten durch Umkristallisieren gereinigt werden. D,L- β -Hydroxybutyryl- und D,L- β -Hydroxyhexanoyl-N-Acetylcysteamin wurden über eine Kieselgelfertigsäule von Merck Größe A, Si60 mit Laufmittelsystem Äthanol/Chloroform/Essigester=2:30:10 gereinigt. In Tabelle 10 sind die Ausbeuten und Schmelzpunkte der synthetisierten β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteaminderivate zusammengefaßt.

Zahl der C-Atome der Säurekompo- nente	Ausbeute des gereinigten Thioesters nach DTNB-Bestim- mung [%]	umkristallisiert aus bzw. gerei- nigt über	F.p. (°C)
4	55	Kieselgelsäule*	-
6	20,7	Kieselgelsäule*	45-46,5
8	54,9	Äther/Petrol- äther	71-71,5
10	59,5	Äther	85
12	45,3	Methylenchlorid	93

Tab. 10: Ausbeuten und Schmelzpunkte der synthetisierten D,L- β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteaminderivate

* Kieselgelsäule Merck Größe A, Laufmittel $\text{EtOH}/\text{CHCl}_3/\text{Essig-}$
ester = 2:30:10 (v/v), Durchflußgeschwindigkeit: 6 ml/10 min

Die eluierten Fraktionen der Kieselgelsäulen (bei den Pantetheinderivaten und dem Crotonylthioester wurde gleichermaßen verfahren) wurden im Tüpfeltest auf DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ aufgetragen. Im UV-Licht konnten die organischen Produkte erkannt werden. Anschließend wurde mit Sprühreagenz A und B zwischen Thioester und Thiol nach Stadtman (100) unterschieden.

Lösg. A: 1,5g Nitroprussidnatrium, 5 ml 2N H₂SO₄, 95 ml Methanol und 10 ml 25 % NH₃-Lösung

Lösg. B: 2g NaOH 5 ml H₂O und 95 ml Methanol

Im Falle des Thioesters gab es erst nach Besprühen mit A und B eine positive Nitroprussid-Reaktion.

Crotonyl-N-Acetylcysteamin mußte nach der Destillation bei 10⁻⁴ Torr (Ölbadtemperatur: 145-170° C) noch über eine Kieselgelsäule (EtOH/CHCl₃/Essigester) gereinigt werden. Schmelzpunkt: 62-63° C, wie nach Seubert (29)

Pantetheinthioester:

Die D,L-β-Hydroxyacylpantetheinderivate mußten alle über zwei ineinander gesteckte Kieselgelsäulen (Merck Größe A, Si 60) mit Laufmittel Butanol/Wasser/Eisessig wie 4:5:1 der Oberphase gereinigt werden, Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/10 min. Die gereinigten Thioester wurden als farbloses Öl isoliert.

7.2.1.2. Enzymatische Synthese von D-(-)β-Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin

Die enzymatische Synthese des D-(-)-Antipoden des Thioesters erfolgte nach Weithmann (13) mit 670 µMol Crotonyl-N-Acetylcysteamin und 35,6 mg FSS in 20 ml 0,2 M KPO₄ pH 6,5 bei 25° C während 88 h. Der Blindversuch unter identischen Bedingungen ohne Enzym, zeigte durch ein Spektrum vor und nach 88 h (Extinktionsmaximum des Crotonylthioesters bei 263 nm), daß eine Hydratisierung von Crotonyl-N-Acetylcysteamin ohne Enzym nicht stattgefunden hatte. Die Lösung

wurde durch Gefriertrocknung auf 15 ml eingengt, mit Ammoniumsulfat auf 100 % der Sättigung gebracht und anschließend bei 6000 rpm 40 min (bei 25° C) zentrifugiert. Der Überstand der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung wurde 4x mit je 50ml Essigsäureäthylester extrahiert. Nachdem die vereinigten und filtrierten organischen Extrakte am Rotationsverdampfer 30 min eingengt worden waren, wurde anschließend bis zur Trockene an der Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Die Auftrennung von D-(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin und Crotonyl-N-Acetylcysteamin erfolgte an der Kieselgelsäule im System: Äthanol/Chloroform/Essigester = 2/30/10 (v/v). Die Ausbeute des D-(-)-Thioesters lag nach UV- und DTNB-Gehaltsbestimmung bei 57 % der Theorie des chemischen Gleichgewichts von Crotonyl-CoA zu L-(+)- β -Hydroxybutyryl-CoA nach Stern (38) mit 1:3,45.

7.2.1.3. Reinheitskriterien der Modellsubstrate

- a) Alle gereinigten β -Hydroxyacylthioester zeigten das typische UV-Spektrum (Abb. 5, I Seite 9) mit einem Maximum bei 263 nm, und das Spektrum von Crotonyl-N-Acetylcysteamin hatte ein Maximum bei 225nm und bei 263nm (Abb. 5, II).
- b) Für die N-Acetylcysteaminderivate der D,L- β -Hydroxyhexansäure, D,L- β -Hydroxyoctansäure, D,L- β -Hydroxydecan-säure und der D,L- β -Hydroxydodecansäure wurden die Werte der Schmelzpunktbestimmung in Tabelle 10 angeführt.
- c) Die gereinigten Modellsubstrate waren nach der Dünnschichtchromatographie rein, die Flecke der freien Säuren und des freien Thiols bzw. des Disulfids verschwanden nach der präparativen Säulenchromatographie. In Tabelle 11 sind die R_f-Werte der niederkettigen N-Acetylcysteaminthioester im System Äthanol/Chloroform/Essigester = 2/30/10 (v/v) auf Kieselgeldünnschichtplatten zusammengefaßt.

Modellsubstrat	gefundener Rf-Wert	Literatur-Rf-Wert
D, L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetyl-cysteamin	0,23	0,28 (8)
D(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetyl-cysteamin	0,23	0,28 (8)
Crotonyl-N-Acetylcysteamin	0,46	0,53 (8)
D, L- β -Hydroxyhexanoyl-N-Acetyl-cysteamin	0,22	

Tab. 11: Rf-Werte der N-Acetylcysteaminderivate im System Äthanol/Chloroform/Essigester = 2:30:10 (v/v) auf Kieselgeldünnschichtplatten

D-(-)- β -Hydroxybutyryl- und D, L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetyl-cysteamin zeigten im Laufmittelsystem 0,1 N Na-Acetat pH 4,5/Äthanol = 1:1 (V/V) den gleichen Rf-Wert von 0,62.

In der Tabelle 12 sind die Rf-Werte der D, L- β -Hydroxyacylpantetheinderivate in zwei Laufmitteln auf Dünnschichtplatten zusammengefaßt.

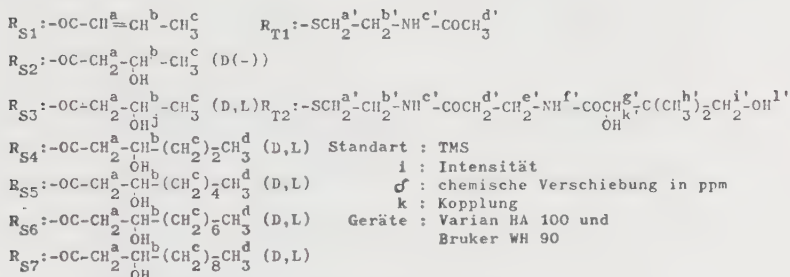
Zahl der C-Atome der Säurekomponente	Rf-Werte im Laufmittel Äthanol/0,1 N Na-Acetat = 1:1 (v/v)	Rf-Werte im Laufmittel: Butanol/Wasser/Essigsäure = 4:5:1 (v/v) Oberphase
4	0,76	0,64
6	0,78	0,65
8	0,74	0,58
10	0,78	0,69
12	0,69	0,65

Tab. 12: Rf-Werte der D, L- β -Hydroxyacylpantetheinderivate in zwei Laufmittelsystemen auf Kieselgeldünnschichtplatten

7.2.1.4. Identifizierung der Modellsubstrate durch ¹H-NMR-Spektroskopie*

Säurereste (R_S)

Thiolreste (R_T)



		H ^a	H ^b	H ^c	H ^d			H ^{a'}	H ^{b'}	H ^{c'}	H ^{d'}						
R _{S1} ^R T ₁	i	1	1	3				2	2		3						
	σ	6,18	6,96	1,93				3,11	3,48		1,98						
	k	s	m	s				t	t		s						
R _{S2} ^R T ₁	i	2	1	3				2	2	1	3						
	σ	2,73	4,26	1,24				3,08	3,44	6,22	1,97						
	k	d	m	d				t	t		s						
R _{S3} ^R T ₁	i	2	1	3				2	2	1	3						
	σ	2,74	4,27	1,25				3,06	3,44	6,06	1,98						
	k	d	m	d				t	t		s						
R _{S4} ^R T ₁	i	2	1	4	3			2	2		3						
	σ	2,74	4,1	1,5	0,97			3,06	3,44		1,98						
	k	d	m	m	t			s			s						
R _{S5} ^R T ₁	i	2	1	8	3			2	2	1	3						
	σ	2,72	4,05	1,3	0,89			3,05	3,4	5,9	1,97						
	k	d	m	m	t			t	t		s						
R _{S6} ^R T ₁	i	2	1	12	3			2	2		3						
	σ	2,73	4,07	1,3	0,9			3,08	3,44		1,97						
	k	d	m	m	t			t	t		s						
R _{S7} ^R T ₁	i	2	1	16	3			2	2	1	3						
	σ	2,77	4,07	1,3	0,9			3,08	3,48	6,05	1,94						
	k	d	m	m	t			t	t		s						
R _{S3} ^R T ₂	i	2	1	3				2	2	1	2						
	σ	2,62	4,02	1,09				2,92	3,2	7,64	2,26	3,5	8,04	4,0	0,8	3,71	
	k	d	m	d				t	t		t		s	s	d		
R _{S4} ^R T ₂	i	2	1	4	3			2	2	1	2						
	σ	2,72	4,29	1,5	1,03			3,0	3,5	6,42	2,44	3,5	7,37	4,0	0,94	3,5	
	k	d	m	m	t			t	t		t		s	s	s		
R _{S5} ^R T ₂	i	2	1	8	3			2	2	1	2						
	σ	2,71	4,2	1,31	0,96			3,06	3,48	7,04	2,45	3,48	7,56	4,0	0,96	3,48	
	k	d	m	m	t			t	t		t		s	s	s		
R _{S7} ^R T ₂	i	2	1	16	3			2	2	1	2						
	σ	2,82	4,29	1,3	0,95			3,03	3,5	7,08	2,46	3,5	7,56	4,02	0,95	3,5	
	k	d	m	m	t			t	t		t		s	s	s		

Die Spektren von R_{S1}^RT₁, R_{S4}^RT₁ und R_{S6}^RT₁ wurden in CDCl₃+D₂O und von R_{S2}^RT₁, R_{S3}^RT₁, R_{S5}^RT₁, R_{S7}^RT₁, R_{S4}^RT₂, R_{S5}^RT₂ und R_{S7}^RT₂ in CDCl₃ angefertigt, im Spektrum von R_{S3}^RT₂ in DMSO gab es folgende ppm-Werte für die alkoholischen Protonen H^j: 4,76 H^k: 5,33 H^l: 4,45

* Für die Anfertigung und Interpretation der NMR-Spektren bin ich Frau G. Schild und Herrn Dr. J. Sonnenbichler, MPI für Biochemie, Martinsried, zu großem Dank verpflichtet.

7.2.2. Messung der Dehydrataseaktivität der Modellsubstrate

7.2.2.1. Dehydrataseaktivität in Abhängigkeit der THF-Konzentration (Abb. 6).

Zu 5,87 μ g FSS (Gesamtaktivität 1,4 E/mg) wurden verschiedene Mengen an THF zupipettiert. Nach 2 min wurde mit 4,6 μ Mol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein gestartet.

7.2.2.2. Messung des pH-Wirkungsoptimum der Dehydratase (Abb. 7)

1 ml Küvettenvolumen enthielten 200 μ M Tris/HCl pH 5,5 - 9 und 4,6 μ Mol D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein. Gestartet wurde mit 5,4 μ g FSS (Gesamtaktivität 2800mE/mg). Der pH-Wert der Küvettenlösung wurde nach der Dehydratasemessung gemessen. In der Referenzküvette befand sich jeweils Substrat + Puffer und nur Puffer, wobei die Extinktionsänderung pro Zeit die gleiche blieb.

7.2.2.3. Anfertigung der Substratabhängigkeitskurven

N-Acetylcysteaminderivate

1 ml Küvettenvolumen im Meßstrahlengang und im Referenzstrahlengang enthielten:

200 μ Mol Tris/HCl pH 7,5, 0,5 - 2 mg FSS. Gestartet wurde mit 0,5 - 8 μ Mol β -Hydroxyacyl-N-Acetylcysteamin

Pantetheinderivate

Nach Abschnitt 7.1.4.2 e) wurden 0,5 - 9 μ Mol D,L- β -Hydroxyacylpantethein vorgegeben. Gestartet wurde mit 3 - 7 μ g FSS.

In Tabelle 13 ist die Anzahl der Messungen mit gleichen Substratkonzentrationen angegeben, aus denen der Mittelwert für die Auftragung der Substratabhängigkeitskurve berechnet wurde.

Modellsubstrat	Zahl der Messungen mit gleicher Substratkonzentration	Maximale Abweichung vom Mittelwert (%)
D-(-)- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin	3	$\pm 4,2$
D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin	1	-
D,L- β -Hydroxyhexanoyl-N-Acetylcysteamin	4	$\pm 5,5$
D,L- β -Hydroxyoctanoyl-N-Acetylcysteamin	3	± 5
D,L- β -Hydroxydecanoyl-N-Acetylcysteamin	4	± 5
D,L- β -Hydroxydodecanoyl-N-Acetylcysteamin	4	$\pm 11,5$
D,L- β -Hydroxybutyryl-Pantethein	3	$\pm 5,5$
D,L- β -Hydroxyhexanoyl-Pantethein	4	$\pm 3,5$
D,L- β -Hydroxyoctanoyl-Pantethein	4	$\pm 5,3$
D,L- β -Hydroxydecanoyl-Pantethein	5	$\pm 4,7$
D,L- β -Hydroxydodecanoyl-Pantethein	6	± 6

Tab. 13: Anzahl der Messungen mit gleichen Substrat- und Enzymkonzentrationen zur Bildung des Mittelwerts für die Auftragung der Substratabhängigkeitskurven

7.2.2.4. Stabilität des dehydratisierenden Enzyms (Abb. 12)

Aus einer Lösung von 0,7 mg FSS in 1 ml 0,1 M KPO_4 pH 6,5 0,02% NaN_3 bei 25° wurden in bestimmten Zeitabständen Aliquote mit je 7 μg für die Messung der Gesamtaktivität und der Dehydrataseaktivität (mit 0,36 μMol D,L- β -Hydroxyoctanoylpantethein) entnommen.

7.2.2.5. Kontrollexperimente zur Messung der Dehydrataseaktivität

- a) Bestimmung des chemischen Gleichgewichts der Dehydratisierung (Abb. 5):

Die Bestimmung des chemischen Gleichgewichtes der Dehydratisierung von D-(-)-8-Hydroxybutyrylpantethein wurde mit 1,01 μMol des Racemats (0,5005 μMol D (-)-Antipode) und 7,26 μg FSS durchgeführt. Nach 2 1/2 h wurde die Extinktion bei 263 nm abgelesen. Mit 0,86 μMol D,L-8-Hydroxyoctanoylpantethein und 7,3 μg FSS sowie mit 0,126 - 0,38 μMol D,L-8-Hydroxydecanoyl-Pantethein und 6,8 μg FSS konnte der Endwert schon nach 30 min abgelesen werden.

- b) Enzymabhängigkeit der Dehydratisierungsgeschwindigkeit:

Von allen Modells substraten wurde bei konstanter Substratkonzentration die Enzymabhängigkeit der Dehydratisierungsgeschwindigkeit im Bereich von 2-15 μg FSS (1ml Küvettenvolumen) gemessen. Es wurde immer eine lineare Enzymabhängigkeit der Dehydratisierungsgeschwindigkeit gemessen.

7.3. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 3:

Vorversuche zur Anreicherung enzymatisch aktiver Bruchstücke.

Die limitierte Proteolyse von FSS mit verschiedenen Proteasen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Inkubationsansatz

2 - 10 mg FSS wurden von 0,1 - 1,2 mg Protease bis zu 6 h in 200 - 400 µl Pufferlösung verdaut.

Zu der FSS-Lösung wurden die Proteasen Clostripain, Protease aus der Unterkieferdrüse der Maus, Elastase aus Schweinepankreas, Trypsin aus Rinderpankreas, Papain, Subtilisin und α -Chymotrypsin von Boehringer, Mannheim, Elastase aus Schweinepankreas, Papain und Thermolysin von Serva, Heidelberg, Protease *S. aureus* von Miles, Frankfurt, in der enzymatisch aktivsten erhältlichen Form in wässriger Lösung zugegeben.

Die Protease aus *S. aureus* und Thermolysin wurden aus Stocklösungen entnommen, die im Tiefkühlschrank aufbewahrt wurden. Die Protease aus *S. aureus* lag in Wasser vor, Thermolysin wurde nach Matsubara (102) in wenig 10 mM Tris/HCl pH 8,2 1 mM CaCl_2 im Eisbad aufgenommen, mit 0,2 N NaOH vorsichtig zum Lösen gebracht und sofort mit 0,2 N Essigsäure auf pH 8,0 angesäuert.

Elastase und Papain von Boehringer Mannheim wurden als Kristallsuspension zugegeben.

Trypsin-Enzygel gebunden an Polyacrylamid von Boehringer, Ficin und Pronase an Carboxymethylcellulose gebunden von Sigma, München, wurden in 5 - 15 mg Mengen zur FSS-Lösung zugegeben.

FSS wurde in folgenden Pufferlösungen proteolytisch gespalten:

Tris/HCl-Puffer (Molarität ohne Angabe bezieht sich auf Tris/HCl):

Clostripain, Protease aus der Unterkieferdrüse der Maus, Trypsin, Thermolysin, Subtilisin, (0,1 M pH 7,5 25 mM CaCl_2), Elastase (0,1 M pH 8,2) Trypsin-Enzygel, α -Chymo-

trypsin (0,1 M pH 8,0 10 mM CaCl_2), Papain (0,1 M pH 8,0 30 mM K-EDTA), Pronase (0,1 M pH 8,0 3 mM NaCl , 3 mM CaCl_2) Trypsin (0,7 M pH 7,5 10 mM CaCl_2 26 % Glycerin (v/v)). Papain (0,07 M pH 8,0 30 mM K-EDTA 30 % Glycerin (v/v)).

K-PO_4 -Puffer (Molarität ohne Angabe bezieht sich auf KPO_4 -Puffer):

Protease aus *S. aureus* (0,1 M pH 7,5), Ficin (0,1 M pH 7,0 3 mM K-EDTA), Proteinase K und Subtilisin (0,06 M pH 7,5 29 % Glycerin (v/v)).

NH_4HCO_3 -Puffer (Molarität ohne Angabe bezieht sich auf NH_4HCO_3 -Puffer):

Protease *S. aureus* (0,1 M pH 7,8), nach Drapeau (52) spaltet die Protease in diesem Puffer nur nach Glu $\downarrow$.

2. Kinetik der Verdauung.

Nach 5 min und jeder folgenden vollen Stunde nach Start der Proteolyse wurde ein Aliquot (10-40 μl) entnommen, mit einem geeigneten Inhibitor versetzt, ein Aliquot aus diesem gestoppten Spaltansatz entnommen und für enzymatische Aktivitätsmessungen 1:10 verdünnt. Der unverdünnte, gestoppte Spaltansatz wurde sofort im Tiefkühlschrank bis zur Verwendung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese eingefroren.

Hemmung:

Die Hemmung der Metallo-Endopeptidasen erfolgte mit 20 μl 1 M K-EDTA (Clostripain und Thermolysin), die Serin-Proteasen wurden durch Zugabe von 10 μl PMSF (70 mg/1 ml Aceton) gehemmt (Protease aus der Unterkieferdrüse der Maus, Elastase, Proteinase K, Subtilisin, α -Chymotrypsin). Die Protease aus *S. aureus* und Trypsin wurden mit 10 - 30 μl Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (10 mg/100 μl) gehemmt.

Die immobilisierten Proteasen Ficin, Pronase und Trypsin-Enzygel wurden durch Zentrifugation (2 min bei 9000 g) entfernt. Um die Inaktivierung der Protease durch den Inhibitor verfolgen zu können, wurde zum Zeitpunkt 0 zu

einem Aliquot der FSS-Lösung die Protease mit deren Inhibitor unter identischen Bedingungen zugegeben. Die Hemmung der Gesamtaktivität blieb nach 6 h immer unter 10 %.

Messung der enzymatischen Aktivitäten:

Die gestoppten Spaltansätze wurden auf ein Endvolumen von 100 μ l mit 0,1 M KPO_4 pH 6,5 verdünnt. Dann wurden Aliquote (50 μ l) entnommen und mit 0,1 M KPO_4 pH 6,5 1:10 verdünnt. Aus diesen 1:10 Verdünnungen wurden sofort 10 - 30 μ l Proben (ca. 15 μ g FSS) für die enzymatischen Tests eingesetzt.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Die eingefrorenen Proteinproben der zeitabhängigen Proteolyse wurden aufgetaut, mit dem Lämmli-Spaltpuffer (91) 1:3 verdünnt, und nach Abschnitt 7.1.3.5. b einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen.

7.4. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 4 :

Isolierung der Acetyltransferase - und der Dehydratasekomponente aus Fettsäuresynthetase nach limitierter Proteolyse

7.4.1. Hydrolyse der Fettsäuresynthetase mit Elastase

1 - 2 g FSS der Ammonsulfatsuspension (90 % der Sättigung) wurden in 260 ml 0,1 M KPO_4 pH 6,5 gelöst und 14 h bei 5°C mit 20000 rpm zentrifugiert.

Der Niederschlag der Zentrifugation wurde in 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 zu einer Konzentration von 110-120 mg/ml gelöst.

Nach der Proteinbestimmung erfolgte die Messung der spezifischen Gesamtaktivität und der spezifischen Acetyltransferaseaktivität.

Die enzymatische Aktivität der eingesetzten Charge an Elastase aus Schweinepankreas (Lyophilisat von Serva) wurde mit Ac-Ala₃-p-Nitroanilid (Serva) nach Feinstein et al. (103) gemessen. Der optische Test bei 410 nm wurde am Spektralphotometer DMR21 mit folgenden Änderungen durchgeführt.

1 ml Referenz-Küvettenvolumen enthielten:

0,1 ml Ac-Ala₃-p-Nitroanilid (2 mg/ml DMSO)

0,1 ml 1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0

20 µl 10 mM Na-Acetat-Lösung

0,78 ml H₂O

1 ml Meß-Küvettenvolumen enthielten:

20 µl Elastase (≈ 1 mg in 1 ml 10 mM Na-Acetat-Lösung)

0,1 ml 1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0

0,78 ml H₂O

Start mit 0,1 ml Ac-Ala₃-p-Nitroanilid (2 mg/ml DMSO)

Meßtemperatur: 25°C

Bei allen Elastase-Chargen blieb die enzymatische Aktivität bei diesem Test zwischen 3,5 - 3,9 ΔE/Min bezogen auf 1 mg Elastase.

Inkubation:

Zu der FSS-Lösung wurde Elastase als Lyophilisat im Verhältnis FSS:Elastase = 15:1 (w/w) unter Rühren zugegeben.

Beendigung der Proteolyse:

Nach ca. 15 min und nach 30 min wurden Aliquote aus dem Reaktionsansatz entnommen und deren Gesamtaktivität wie Acetyltransferaseaktivität gemessen. Lag die Gesamtaktivität unter 10 % der Ausgangsaktivität (Abb. 18), wurde die Proteolyse mit 200 µl PMSF-Lösung (70mg/ml Aceton) gestoppt.

7.4.2. Entfernung ungespaltener Fettsäuresynthetase durch Ultrazentrifugation

Bei 45000 rpm wurde der durch PMSF-Zugabe aufgetretene Niederschlag und unverdaute FSS 3 1/2 - 4 h bei 5°C zentrifugiert.

7.4.3. Auftrennung des Elastase-Spaltgemisches durch Gelfiltration

Ultrogelschritt 1:

Der Überstand der Zentrifugation (ca. 16 ml) wurde mit 20 % Glycerin (v/v) auf eine Ultrogel AcA 44-Säule aufgetragen. Weitere Angaben: Siehe Legende zu Abb. 19. Nach 8 h Elution mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 durch eine Schlauchpumpe wurde beim Eluieren fraktioniert. Dann wurden die Fraktionen der 4 Proteingipfel (ΔE_{280nm}) mit 10µl-Aliquote nach Acetyltransferaseaktivität ausgetestet. Die vereinigten Fraktionen der Proteingipfel wurden im Eisbad mit $(NH_4)_2SO_4$ zu 80 % der Sättigung gefällt und über Nacht bei 5°C stehen gelassen. Die gefällten Proteingipfel wurden am nächsten Tag 2 h bei 13000 rpm zentrifugiert, die Niederschläge in wenig 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 aufgenommen und gegen den selben Puffer (1 Liter) 2 x 1 h dialysiert.

Ultrogelschritt 2:

Nachdem die enzymatischen Aktivitäten des dialysierten Proteingipfels III (117 mg in 14 ml bei 2 g FSS-Ansatz, Tab. 8) gemessen wurden, erfolgte die Probenauftragung mit 20 % Glycerin an der 2. Ultrogelsäule. Weitere Angaben: siehe Legende zu Abb. 20. Nach ca. 7 h Elution mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 wurde beim Eluieren fraktioniert.

Unter den Bedingungen des Ultrogelschrittes 1 wurden die Gipfelfraktionen der Proteingipfel ausgetestet, die Proteingipfel gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2 x 2 h gegen 20 mM $K-PO_4$ -Puffer (2 Liter) pH 7,0 dialysiert.

7.4.4. Auftrennung der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente durch Chromatographie an Hydroxylapatit.

Nach der Messung der enzymatischen Aktivitäten des dialysierten Proteingipfels II nach Ultrogelschritt 2 (45 mg in 7 ml, Tab.6) erfolgte die Probenauftragung an der Chromatographiesäule mit Hydroxylapatit HT von BioRad, München. Weitere Angaben: siehe Legende zu Abb. 21.. Der Proteingipfel I a und b wurde mit Startpuffer 20 mM KPO_4 pH 7,0 eluiert. Nach 240 ml Startpuffer wurde mit 70 mM KPO_4 -Puffer pH 7,0 Proteingipfel II eluiert, und anschließend nach 200 ml 70 mM KPO_4 -Puffer wurde Proteingipfel III mit 125 mM $K-PO_4$ -Puffer eluiert. Das Gewichtsverhältnis der Ausbeuten an Acetyltransferasekomponente mit 23 mg (Proteingipfel Ia, Ib und II) und an Dehydratasekomponente mit 5 mg (Proteingipfel III) blieb bei allen Anreicherungen annähernd gleich.

7.5. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 5:

7.5.1. Molekulargewichtsbestimmungen

7.5.1.1. Bestimmung des Molekulargewichts nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts

Die Gleichgewichtszentrifugationen wurden mit Hilfe eines Sechskanalmittelstückes Beckmann Modell E mit Scanner-Optik und Rotor An-H durchgeführt.

Acetyltransferasekomponente

$$\Delta E_{280 \text{ nm}} = 0,396 \text{ in } 0,02 \text{ M KPO}_4 \text{ pH } 7,0$$

Das Gleichgewicht wurde nach 22 h mit 11 000 rpm bei 20°C erreicht.

Dehydratasekomponente

$$\Delta E_{280 \text{ nm}} = 0,404 \text{ in } 0,02 \text{ M KPO}_4 \text{ pH } 7,0$$

Das Gleichgewicht wurde nach 19 h mit 11 000 rpm bei 20°C erreicht.

7.5.1.2. Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese.

Die Molekulargewichte der Acetyltransferasekomponente und der Dehydratasekomponente wurden nach Weber und Osborn (60) mit linearem Gradienten nach Laemmli (61) durch SDS-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese bestimmt. Es wurden jeweils ca. 13 µg FSS, Elastase, Proteingipfel Ia, Ib, II und III (nach Hydroxylapatitchromatographie), β' (in Proteingipfel II nach Ultrogelschritt 1, Abb. 51) und Low-Molecular-Weight-Standards (BioRad Kit II) in die Geltaschen gegeben. Abb. 27 beinhaltet nicht die Auswertung der niedermolekularen Bande von Proteingipfel II (n. Hydroxylapatitchromatographie) mit 40×10^3 Dalton und β' mit 90×10^3 Dalton.

7.5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

7.5.2.1. Acetyltransferasekomponente

Die Messung der Acetyltransferaseaktivität erfolgte nach Weithmann (13) mit den Änderungen nach Abschnitt 7.1.4.2.b in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen Acetylpantethein und Coenzym A nach Florini und Vestling (65).

Es wurden die konstanten Mengen an 10,4 µg ATC (Proteingipfel Ia nach Hydroxylapatitchromatographie mit der spezifischen Acetyltransferaseaktivität von 53 E/mg) in den optischen Tests eingesetzt.

Die Konzentrationen an Acetylpantethein in der Meßküvette lagen zwischen 0,0515 mM und 1,03 mM bei jeweils 3 verschiedenen konstanten Konzentrationen an Coenzym A (die Coenzym A-Konzentrationen sind der Legende von Abb. 29 zu entnehmen). Die Konzentrationen an Coenzym A in der Meßküvette lagen zwischen 0,0387 mM und 0,774 mM bei jeweils 3 verschiedenen konstanten Konzentrationen an Acetylpantethein (die Acetylpantetheinkonzentrationen sind der Legende von Abb. 28 zu entnehmen).

7.5.2.2. Dehydratasekomponente

Die Messung der Dehydrataseaktivität erfolgte nach Abschnitt 7.1.4.2.e in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Die Substratabhängigkeit wurde durchgeführt mit 10,25 µg Dehydratasekomponente (Proteingipfel III nach Hydroxylapatitchromatographie mit der spezifischen Dehydrataseaktivität von 8,3 E/mg). Die Konzentrationen an D,L-β-Hydroxybutyrylpantethein lagen zwischen 1,06 mM und 3,18 mM.

7.5.3. Bestimmung des isoelektrischen Punkts

7.5.3.1. Isoelektrische Säulenfokussierung

In einer 110 ml Elektrofokussier-Säule von LKB wurde folgender Gradient aufgeschichtet:

Schwerer Teil:

3,0 ml 40 % Ampholine (LKB) pH 3,5 - 10
23,4 g Saccharose
200 µl Proteinlösung 1,2 mg (Proteingipfel II nach Ultro-
gelschritt II)
4,8 ml 10 %ige Nonidet-Lösung
ad 48 ml H₂O

Leichter Teil:

2 ml 40 % Ampholine pH 3,5 - 10
4,8 ml 10 %ige Nonidet-Lösung
ad 48 ml H₂O

Anodenlösung:

15 g Saccharose
4 ml 1 M H₃PO₄
ad 25 ml H₂O

Kathodenlösung:

0,4 ml Äthanolamin
20 ml H₂O

Während der ersten Stunde wurde mit 250 Volt und 4 mA fokus-
siert, dann wurde das System auf eine konstante Leistung von
2 W stabilisiert. Weitere Einzelheiten: siehe Legende zu Abb.34.

5.3.2. Isoelektrische Flachbettfokussierung

Nach dem Auftragen von Acetyltransferase- und Dehydratasekompo-
nente durch Auflegen von kleinen Papierschnitzel mit Protein-
lösung (weitere Angaben: siehe Legende von Abb. 35), wurde
das System auf eine konstante Leistung von 30 W stabilisiert.
Das Auflegen des Ampholine-"PAG plate", das Auftragen der Pro-
ben, das Tränken der Elektrodenstreifen, die Ausmessung des
pH-Gradienten, weiteres Fokussieren nach den pH-Messungen, und

Färbung und Entfärbung des Ampholine-Gels wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (107).

7.5.4. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen für Acetyl-CoA an der Acetyltransferasekomponente

Die Bestimmung der Zahl der Acetatbindungsstellen wurden durchgeführt am Proteingipfel II nach dem 2. Ultragelschritt. Nach Messung der Acetyltransferase- und der Dehydrataseaktivität handelte es sich um ein Acetyltransferasebruchstück (spezifische Acetyltransferaseaktivität: $41 \text{ E/mg} \hat{=} 83 \%$ der Proteingipfel I und II nach Hydroxylapaptitchromatographie), daß mit 17% Dehydratasebruchstück verunreinigt war (spezifische Dehydrataseaktivität: $1,4 \text{ E/mg} \hat{=} 17 \%$ des Proteingipfels III nach Hydroxylapaptitchromatographie). Deshalb wurde nach der Proteinbestimmung nach Bradford (69) das Ergebnis mit dem Faktor 0,83 korrigiert.

Die korrigierte Mengenangabe für das Acetyltransferasefragment in nMol bezog sich auf das Molekulargewicht nach der Bestimmungsmethode des Sedimentationsgleichgewichts (Abschnitt 5.1.1.). Das Inkubationsvolumen betrug $200 \mu\text{l}$ (weitere Angaben: siehe Legende zu Abb. 37 und 38).

7.5.4.1. Radioaktive Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen

Folgende Vorversuche wurden mit Proteinlösungen durchgeführt, deren Acetyltransferaseaktivität durch häufiges Auftauen und Einfrieren unter 41 E/mg gefallen war:

1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach $1\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Acetyl-CoA}$ -Beladung mit Autoradiographie (Abb. 36).
2. Einfluß der Inkubationsdauer von Acetyl-CoA auf die Beladungszahl des Acetyltransferasekomponente (Abb. 37).
3. Einfluß des molaren Verhältnisses von Acetyl-CoA und Protein im Inkubationsansatz auf die Beladungszahl (Abb. 38)

Die Auftrennung von Protein und freiem $1\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Acetyl-CoA}$ bzw. $1\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Acetat}$ durch Gelfiltration nach den optimalen Beladungsbedingungen zeigt Abb. 55. Aus der Bestimmung der

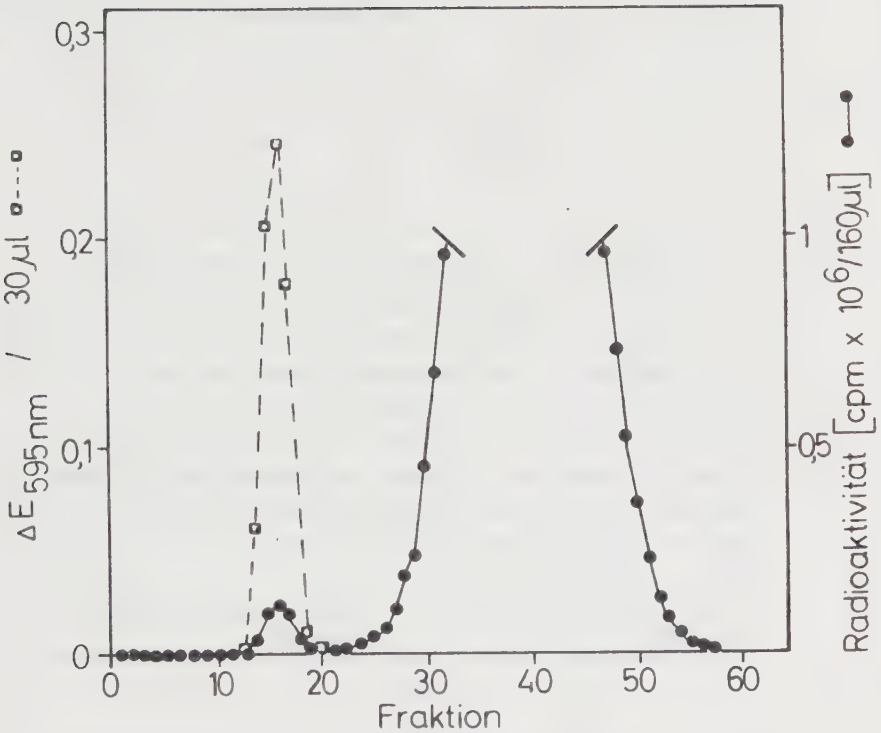


Abb. 55 : Auftrennung von Protein und freiem 1-[¹⁴C]-Acetyl-CoA bzw. 1-[¹⁴C]-Acetat und CoA-SH durch Gelfiltration nach den optimalen Beladungsbedingungen:

Inkubation von 6,3 n Mol Acetyltransferasebruchstück in 0,1 M KPO₄ pH 6,5 mit 355 n Mol 1-[¹⁴C]-Acetyl-CoA (44,1 μCi/ μmol) 8 Min bei 0 °C. Abgestoppt mit Gu/HCl auf 5 M. Aufgetragen auf Sephadex G 50 -Säule.

Gelfiltration

Probenvolumen: 200 μl, Säulendurchmesser: 6mm, Gelbetthöhe: 10 cm, Puffer: 0,1 M KPO₄ pH 6,5 5 M Gu/HCl, Fraktionsvolumen: 240 μl, Durchflußgeschwindigkeit: 0,7 ml/ min, 4 °C .

Proteinbestimmung

Je 30 μl Fraktionsaliquote + 70 μl H₂O + 1 ml Bradford-Proteinreagenz (69) in Meßküvette.

Je 30 μl 0,1 M KPO₄-Puffer pH 6,5 5 M Gu/HCl + 70 μl H₂O + 1 ml Proteinreagenz in Referenzküvette.

Eichung und weitere Einzelheiten der Messung (Abschn. 7.1.3.1.)

Molmenge ATC der Fraktionen 13-21: 5,09 nMol

Radioaktivitätsbestimmung

Auszählung von je 160 μl Fraktionsaliquote + 5 ml Unisolve 1
Cpm der Fraktionen 13-21: 395 x 10³ = 4,8 nMol 1-[¹⁴C]-Acetat

gesamten Proteinmenge und der Radioaktivität im schneller wandernden Proteingipfel wurde das Verhältnis von nMol Acetyltransferasekomponente zu nMol proteingebundenem 1-[^{14}C]-Acetat errechnet (s. Legende zu Abb. 55).

Die Proteinbestimmung der Fraktionen nach Bradford erfolgte im Mikrotest (Abschnitt 7.1.3.1.)

Untersuchung zur Stabilität des proteingebundenen 1-[^{14}C]-Acetats gegenüber Perameisensäure nach Sanger (71).

5,6 n Mol Acetyltransferasekomponente wurden in 20 mM KPO_4 pH 7,0 8 Min bei 0°C mit 850 nMol 1-[^{14}C]-Acetyl-CoA (58,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) in einem Probenvolumen von 170 μl inkubiert und mit 82,6 mg Gu/HCl abgestoppt (5M).

Nach der Auftrennung von Protein und niedermolekularen Anteilen nach der beschriebenen Methode in Abb. 55 wurde der Proteinanteil gegen 1 l Wasser dialysiert, und nach gründlichem Mischen mit einem Whirlmix in zwei gleiche Teile überführt und jeweils lyophilisiert.

Die beiden Proben wurden in je 150 μl Wasser gelöst, eine Probe wurde mit 500 μl frisch bereiteter Perameisensäure (108), die andere Probe mit 500 μl Ameisensäure im Eisbad 4 h inkubiert.

Danach wurden die Proben erneut lyophilisiert und in je 200 μl 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 7,5, 5 M Gu/HCl gelöst.

Die Ermittlung der proteingebundenen Acetatmenge erfolgte nach Abb. 55.

7.5.4.2. Optische Bestimmungsmethode der Acetatbindungsstellen und der Deacylaseaktivität mit DTNB

Die Inkubation von 24,6 mg FSS erfolgte in 1,5 ml und von 3,23 mg ATC in 1,055 ml 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5 1 mM DTNB (Seite 59: 1) und 2)). Es wurden Aliquote der FSS-Inkubation (Abb. 40, 200 μl) und der ATC-Inkubation (Abb. 39, 200 μl) entnommen und im Deacylaseaktivitätstest nach Abschnitt 7.1.4.2g eingesetzt. Weitere Angaben: s. Legenden zu Abb. 39 und 40.

7.5.5. Endgruppenbestimmung des N-Terminus der Acetyltransferase- und der Dehydratasekomponente

Die Endgruppenanalyse wurde nach der Standardvorschrift (73,74) mit 1-2 nMol Peptid nach (109) durchgeführt. Folgende Änderungen wurden angebracht:

Das Format der verwendeten, dickwandigen Gläser betrug 5 x 100 mm. Die Reagenzien wurden mit 25 µl-Kapillarpipetten in den untersten Teil der Röhrchen gegeben. Die Hydrolyse in 50 µl 6 N HCl (über SnCl_2 destilliert) dauerte 24 h. Nach dem Öffnen der Röhrchen und Trocknung wurden die Proben mit 10 µl Pyridin/ H_2O = 1/1 gelöst.

Eine Standardmischung aller Dansylaminosäuren (5 µMol in 1 ml Pyridin/ H_2O = 1/1) wurde durch Zusammenpipettieren von je 10 µl Aliquote hergestellt.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf doppelseitig mit Micropolyamid beschichteten Aluminiumfolien des Formats 3 x 3 cm in Solvens I, II, III und IV (109) in kleinen Bechergläsern.

7.6. Versuchsbeschreibung zu Kapitel 6:
Untersuchungen zur Struktur der Fettsäuresynthetase

7.6.1. Immunologische Untersuchungen

7.6.1.1. Immunologische Lokalisierung der Acetyltransferase und der Dehydratase auf den Untereinheiten der Fettsäuresynthetase

1. Herstellung von Kaninchenantikörpern gegen ATC und DHC aus FSS und ACP aus K. aerogenes

Die Proteinproben lagen in 20 mM KPO_4 -Puffer pH 7,0 vor. Zur 1. und 2. Immunisierung wurden sie mit Freund'schem Adjuvans 1:1 versetzt und gründlich gemischt. Die Kaninchen stammten aus einer Eigenzucht des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried. Das 2 ml-Probenvolumen wurde subcutan an 2-3 verschiedenen Stellen gespritzt.

Immunisierungsschema:

- 1. Tag 0,5 mg (*) (ATC, DHC und ACP) mit Freund'schem Adjuvans komplett
- 10. Tag 0,5 mg mit Freund'schem Adjuvans inkomplett
- 20. Tag 0,5 mg
- 28. Tag 0,5 mg
- 36. Tag 0,5 mg
- 43. Tag 0,7 mg
- 50. Tag 1 mg
- 57. Tag Herz-Katheter unter Narkose zur Abnahme des gesamten Blutes

*) ATC: Fr II nach Hydroxylapaptitchromatographie

2. Isolierung der IgG (81)

Die Seren wurden mit 1/50 ihres Volumens an 1 M KPO_4 -Puffer pH 7,5 versetzt, mit Ammoniumsulfat auf 40 % der Sättigung gebracht und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Niederschläge mit 40 % Ammonsulfatlösung gewaschen und gegen 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 50 mM NaCl dialysiert. Die Dialysate wurden an Sephadex G 150 ($\emptyset$:9 cm, Gelbetthöhe:

66 cm, Durchflußgeschwindigkeit: 5 ml/min) mit 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 50 mM NaCl chromatographiert. Die Fraktionen des 2. Proteingipfels wurden vereinigt, auf 40 % der Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht und zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in 50 mM KPO_4 -Puffer pH 7,5 50 mM NaCl aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert.

3. Ouchterlony-Diffusion

Zu 100 ml eines 50 mM KPO_4 -Puffer pH 7,5 50 mM NaCl, 0,02 % NaN_3 (w/w) wurden 0,6 g Agarose zugegeben und auf 70 °C erhitzt, bis die Agarose in Lösung gegangen war. Je 11 ml dieser heißen Lösungen wurden in Kunststoff-Petrischalen ($\varnothing$: 8,8 cm) pipettiert und bei 5 °C aufbewahrt. Später wurden die Löcher ($\varnothing$: 8 mm) in die Agarose gestanzt, in die dann die 50-70 μl der gereinigten IgG-Lösungen bzw. der Seren (Titerbestimmung) pipettiert wurden. Weitere Angaben: s. Legende zu Abb. 41 und 42.

Die Lösungen der Untereinheiten α und β wurden mit Anti- α -IgG und mit Anti- β -IgG, die mir freundlicherweise Herr Dr. F. Wieland (18) zur Verfügung stellte, im Ouchterlony-Test auf ihre Antigenizität überprüft.

6.1.2. Bindungsorte der Antikörper gegen ATC und DHC an nativer FSS

1. Präzipitationsverhalten

Je 38 μg FSS wurden mit steigenden Mengen (0-4,4 mg) Anti-ATC-IgG und (0-6 mg) Anti-DHC-IgG in 200 μl 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5 20 Min bei 25 °C inkubiert.

Nach grundlichem Mischen mit einem Whirlmix wurden der Lösung 80 μl -Aliquote zum optischen Test der Acetyltransferase entnommen. Dann wurde 6 min bei 9 000 g zentrifugiert und dem Überstand 80 μl für die Acetyltransferase-Aktivitätsmessung entnommen.

Auf gleiche Weise wurden 27 μg ATC bzw. 41 μg DHC mit steigenden Mengen Anti-ATC-IgG bzw. Anti-DHC-IgG inkubiert. Der Test erfolgte durch Entnahme von 20 μl -Proben. Der Präzipitationspunkt von ATC lag bei einem 60-fachen Überschuß an

Immunoglobulin (w/w). Die Auswertung des Präzipitationsverhaltens von DHC mit Anti-DHC-IgG bis zum Präzipitationspunkt scheiterte an der zunehmenden Absorption im Dehydratasetest.

2. Hemmverhalten

Die Inkubation nativer FSS mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte am Präzipitationspunkt. Je 128 μg FSS wurden mit 3,82 mg IgG unspezifisch (Kaninchen IgG von Serva) und mit 3,82 mg Anti-DHC-IgG in 500 μl 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 6,5 20 Min bei 25 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Den Inkubationen wurde nach gründlichem Mischen mit einem Whirlmix 50 μl -Aliquote für die Messung der Teilaktivitäten Acetyltransferase, Malonyltransferase, β -Ketoacylreduktase, Dehydratase und Enoylreduktase (1:10 Verdünnung) nach Abschnitt 7.1.4.2. entnommen. Auf gleiche Weise wurde mit je 128 μg FSS und 1,91 mg IgG unspezifisch bzw. 1,91 mg Anti-ATC-IgG verfahren.

Das Hemmverhalten gegenüber den Enzymkomponenten wurde den Präzipitationskurven von ATC und DHC entnommen.

3. Elektronenmikroskopische Untersuchung an nativer FSS mit Anti-ATC-IgG und Anti-DHC-IgG

a) Anreicherung von FSS-IgG-FSS-Komplexen.

Die Anreicherung erfolgte nach Wieland (18,21) durch Inkubation von 5 mg FSS und 1 mg Anti-ATC-IgG bzw. Anti-DHC-IgG in 320 μl 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 7,5 1 h bei 25 $^{\circ}\text{C}$ und 1 h im Eisbad.

Die Proben wurden auf einen 10-40 %igen Rohrzuckergradienten 0,1 M KPO_4 pH 7,5 aufgetragen und im Rotor SW 27 (Beckmann) 15 h bei 25 000 rpm zentrifugiert (4 $^{\circ}\text{C}$). Nach der Rohrzuckerdichtezentrifugation wurde mittels Kanülen, die an einer Schlauchpumpe angeschlossen waren und deren Spitzen zum untersten Teil der Becher reichte, in 0,8 ml Fraktionen eluiert.

b) Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie

Die Proben aus den Rohrzuckergradienten (ΔE_{280} : 0,16-0,18) wurden mit 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 7,5, 5 mM K-EDTA 1 mM DTT,

0,1 mg Rinderserumalbumin/ml 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 verdünnt.

Die mit Kohle bedampften Netze wurden 30-60 sec auf ein Tröpfchen der Proteinproben gelegt, dann 30-60 sec auf die Färbelösung (2 %ige Phosphowolframsäure mit 2 N KOH auf pH 7,0 gebracht) gelegt und mit Seidenpapier am Rand vorsichtig von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Es wurde ein Elektronenmikroskop Elmiskop 101 von Siemens verwendet. Spannung: 80 KV, Belichtungszeit: 3 sec.

7.6.2. Lokalisierung der Transferasen auf der Polypeptidkette β

Die radioaktive Beladung der Acetyltransferase und der Malonyltransferase für die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach Engeser (67) mit folgenden Änderungen:

1. Radioaktive Beladung der Acetyltransferase:

Je 0,4 mg FSS, RSA, Proteingipfel I, II und III (n. 1. Ultragelschritt) wurden in 50 μ l 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM DTNB 30 min bei 25 °C inkubiert.

Die Acetat-Beladung erfolgte durch Zugabe von 60 nMol 1-[14 C]-Acetyl-CoA (25 μ l) 8 min bei 0 °C. Spezifische Radioaktivität: 44,1 μ Ci/ μ Mol.

2. Radioaktive Beladung der Malonyltransferase:

Je 0,9 mg FSS, RSA und je 0,2 mg Proteingipfel I, II und III (n. 1. Ultragelschritt) wurden in 30 μ l 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,0 1 mM DTNB 30 min bei 25 °C inkubiert.

Dann erfolgte die Malonat-Beladung durch Zugabe von 6 nMol 1,3-[14 C]-Malonyl-CoA (15 μ l) 30 min bei 0 °C. Spezifische Radioaktivität: 42,89 μ Ci/ μ Mol.

Abgestoppt wurde die Beladung der Acetyltransferase und der Malonyltransferase durch Zugabe von 225 μ l bzw. 135 μ l Lämmli-Spaltpuffer (91).

7.6.3. Durchstrahlungsrasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahme nativer FSS wurde mit einem Scanning-Transmission-Elektronenmikroskop ST 100 F von Siemens durchgeführt. Belichtungszeit: 0,64 sec, Dosis: $100 \text{ el}/\text{\AA}^2$.

Zusammenfassung

- I Mit neuen Modellsubstraten wurde das dehydratisierende Teilenzym der Fettsäuresynthetase aus Hefe untersucht. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:
- a) Stereospezifität
- Die enzymatisch inaktive L (+)-Antipode von D,L- β -Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin hemmt die enzymatische Wasserabspaltung des D(-)-Antipoden nicht.
- b) Kettenlängenspezifität
- Pro Verlängerung der Kettenlänge der Säurekomponente um zwei C-Atome verdoppelt bis versiebenfacht sich die Dehydratisierungsgeschwindigkeit der β -Hydroxyacylpantethein- und N-Acetylcysteaminderivate.
- c) Spezifität der Thiolkomponente
- Bei Ersatz von N-Acetylcysteamin durch Pantethein erhöhen sich die Geschwindigkeiten der enzymatischen Wasserabspaltung um das 500-fache.
- Es wurde ein einfacher Test mit D,L- β -Hydroxybutyrylpantethein im Zwei-Küvetten-System entwickelt, bei dem sich der Enzymbedarf um das 1000-fache erniedrigt. Damit ist die Messung der Enzymaktivität der Dehydratase in der Hefe-Fettsäuresynthetase aus fraktionierten Eluaten mit geringer Proteinkonzentration möglich geworden.
- II Bei Untersuchungen zur Struktur des Fettsäuresynthetase-Multienzymkomplexes aus Hefe durch limitierte Proteolyse wurden folgende Ergebnisse erhalten:
- a) Die Teilenzyme der Untereinheit α des α_6 - β_6 -Komplexes wurden durch Proteolyse wesentlich schneller inaktiviert als die Teilenzyme der β -Untereinheit.
- Die Proteasen Clostripain, Elastase, Protease aus *S. aureus*, Thermolysin, Trypsin und Subtilisin inaktivierten die Teilenzyme der Hefe-FSS selektiv.

b) Zwei Teilenzyme der β -Kette des Multienzymkomplexes konnten durch limitierte Proteolyse mit Elastase herausgeschnitten werden (111) und über vier Anreicherungsschritte nach den Kriterien der SDS-Gelelektrophorese und der N-terminalen Endgruppenanalyse rein isoliert werden.

Durch Vergleich der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Gelelektrophorese und Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation konnte gezeigt werden, daß sowohl die Dehydratasekomponente als auch das Acetyltransferasekomponente als Monomere vorliegen. Die spezifischen Aktivitäten erhöhen sich im Vergleich zum nativen Komplex bei der Acetyltransferasekomponente um das 9-fache und bei der Dehydratasekomponente um das 3 1/2-fache. Die spezifische Deacylaseaktivität an der Acetyltransferasekomponente erhöhte sich im Vergleich zum FSS-Komplex um das 8-fache. Die Funktion der Deacylase als Nebenreaktion der Acetyltransferase konnte bestätigt werden.

c) Die enzymatisch aktiven Bruchstücke wurden charakterisiert (Molekulargewichtsbestimmung, Bestimmung der kinetischen Konstanten, der scheinbaren isoelektrischen Punkte, der Acetatbindungsstellen und Endgruppenanalyse).

Für ein Molekül Acetyltransferasebruchstück wurde eine Acetatbindungsstelle gefunden.

Der Sättigungsbereich der Modellsubstratabhängigkeit für das Dehydrataseenzym verschob sich vom nativen Komplex zur Dehydratasekomponente zu niedrigeren Substratkonzentrationen.

d) Mit den gegen die Bruchstücke gewonnenen Antikörpern konnten die Teilenzyme der Acetyltransferase und der Dehydratase immunologisch der β -Kette zugeordnet werden.

Die Kreuzreaktion des Dehydrataseantikörpers mit der Acetyltransferasekomponente und die Identifizierung eines kleineren Acetyltransferasebruchstücks werden als Hinweis für die Nachbarschaft der beiden Teilenzyme auf der Primärstruktur der β -Kette angesehen, deren isolierte Enzymkomponenten anscheinend durch eine überlappende Proteolyse entstanden sind.

Der gegen die Dehydratasekomponente gewonnene Antikörper vermochte die Dehydrataseaktivität am FSS-Komplex im Gegensatz zur Dehydratasekomponente nicht zu hemmen.

e) Im Elektronenmikroskop konnten die Bindungsstellen der gegen Acetyltransferase und Dehydratase gewonnenen Antikörper am Multienzymkomplex lokalisiert werden.

f) Es konnte ein Peptid mit Acetat- und Malonatbindungsstellen identifiziert werden.

Aufgrund der experimentellen Befunde muß angenommen werden, daß die zu den enzymatischen Aktivitäten notwendigen Struktureinheiten der Acetyltransferase, der Dehydratase und der Malonyltransferase in Form von autonomen Domänen auf der multifunktionellen Polypeptidkette β der Hefe-FSS liegen und funktionell von einander unabhängig sind.

g) Unter der Annahme, daß alle Teilenzyme der β -Kette als unabhängige Domänen gleichmäßig auf der multifunktionellen Polypeptidkette verteilt sind, wurde die Verteilung dieser Teilenzyme auf der Primärstruktur und in dem von Lynen vorgeschlagenen Modell diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Lynen, F., Federation Proc. 20, 941 (1961)
2. Lynen, F., Hopper-Kessel, I. und Eggerer, H., Biochem. Z. 340, 95, (1964)
3. Lynen, F. in: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen
Gem. Tagung der Dt. Ges. f. physiol. Chem. und der
österreich. Biochem Ges. Wien, 121 , (1962)
4. Sumper, M. Dissertation München (1970)
5. Schönheimer, R., The Dynamic State of Body Constituents
Cambridge: Harvard Univ. Press.
6. Sonderhoff, R. and Thomas, H., Ann. Chem. 530, 195,
(1937)
7. Rittenberg, D., and Bloch, K., J. Biol. Chem. 160, 417,
(1945)
8. Lynen, F., J. Cell Comp. Physiol. 54, Suppl. 1:33,
(1959)
9. Wakil, S.J., J. Am. Chem. Soc. 80, 6465, (1958)
10. Brady, R.O., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 44, 993 ,
(1958)
11. Hagen, A. Dissertation, Universität München, (1963)
12. Willecke, K. Dissertation, Universität München, (1968)
13. Weithmann, K.U. Dissertation, Universität München, (1974)
14. Sumper, M., Riepertinger, D. and Lynen, F., FEBS Letters
5, 45 , (1969)
15. Schweizer, E., Dietlein, G., Gimmler, G., Knobling, A.,
Tahedl, H.W., Schnietz, H. und Schweizer, M.,
Proceeding of the Tenth Febs-Meeting, 85, (1975)
16. Knobling, A., Schiffmann, D., Sickinger, H.D., und
Schweizer, E., Eur. J. Biochem., 56, 359, (1975)
17. Schweizer, E., und Lynen F., in: Transport by Proteins,
(Blauer, G., u. Sund, H., eds.) Walter de Gruyter, Berlin-
New York, 103, (1978)
18. Wieland, F., Dissertation Universität München (1978)
19. Wieland, F., Renner, L., Verfürth, C. and Lynen, F.,
Eur. J. Biochem. 94, 189 , (1979)
20. Engeser, H., Dissertation Universität München, (1978)
21. Wieland, F., Siess, E., Renner L., Verfürth, C. and
Lynen, F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 75,
No. 12, pp. 5792 , (1978)

22. Hofschneider, P.H., Hagen, A. Third European Regional Conference Electr. Microscopy (Czechoslovakian Academy of Science, Prague) 69 , (1964)
23. Pilz, L., Herbst, M., Kratky, O., Oesterhelt, D. and Lynen, F., Eur. J. Biochem. 13, 55 , (1970)
24. Hoppe, W., Schramm, H.J., Sturm, M., Hunsmann, N. and Gassmann, J., Z. Naturforsch. 31a, 1380, (1976)
25. Oesterhelt, D., Bauer, H., Lynen, F. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 1377 , (1969)
26. Schweizer, E., Piccinini, F., Duba, C., Günther, S., Ritter, E., Lynen, F., Eur. J. Biochem. 15, 483, (1970)
27. Yourno, J., Kohno, T., and Roth, J.R., Nature 228, 820, (1970)
28. Hess, Stephan, Dissertation, Universität München, (1977)
29. Seubert, W., Dissertation, Universität München, (1955)
30. Reformatsky, S., Ber. 20, 1210, (1887)
31. Wieland, Th., u. Rueff, L., Angew. Chemie 65, 186, (1953)
32. Pirson, W., Dissertation Universität München, (1970)
33. Ziegenhorn, J., Dissertation Universität München, (1970)
34. Kresze, G.B., Oesterhelt, D., Lynen, F., Castorph, H. und Schweizer, E., Biochem.Biophys.Res.Comm., 69, 893, (1976)
35. Pirson, W., Schuhmann, L., Lynen, F., Eur. J. Biochem. 36, 16 , (1973)
36. Oesterhelt, D., Dissertation, Universität München, (1967)
37. Brock, D.J.H., Kass, L.R., u. Bloch, K., J. Biol. Chem. 242, 4432, (1967)
38. Stern, J.R., del Campillo, A., J. Biol. Chem. 218, 985, (1956)
39. Kumar, S., Dorsey, J.A., Muesing, R.A., Porter, J.W., J. Biol. Chem. 245, 4732, (1970)
40. Majerus, P.W., Alberts, A.W., and Vagelors, P.R., J. Biol. Chem. 240, 618, (1965)
41. Qureshi, A.A., Lornitzo, F.A., Jenik, R.A., and Porter, J.W., Arch. Biochem. Biophys. 177, 364, (1976)
42. Kass, L.R., Bloch, K., Biochemistry 58, 1168, (1967)

43. Kass, L.R., Brock, D.J., Bloch, K., J. Biol. Chem. 242, 4418, (1967)
44. Norris, A.T., Mabumura, S., Bloch, K., J. Biol. Chem. 239, 3653, (1964)
45. Helmkamp, G.M., and Bloch, K., J. Biol. Chem. 244, 6014, (1969)
46. Sedgwick, B., Morris, L., and French, S.J., J. Chem. Soc. Chem. Commun. 5, 193, (1978)
47. Hagen, A., Dissertation Universität München, (1963)
48. Gutfreund, H., Enzymes Physical Principles, 143, (1972)
49. Mitchell, W.M., and Harrington, W., J. Biol. Chem. 243, 18, 4683, (1968)
50. Schenkein, I., Levy, M., Franklin, E.C., and Frangione, B. Arch. Biochem. Biophys. 182, 64, (1977)
51. Drapeau, G.R., Boily, Y., Houmard, J., J. Biol. Chem. 247, 6720, (1972)
52. Drapeau, G.R., Houmard, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3506, (1972)
53. Neurath, H., und Schwert, G.W., Chem. Rev. 46, 69, (1950)
54. Naughton, M.A., Sanger, F. Biochem. J. 78, 156, (1961)
55. Nomoto, M., Narashi, Y., J. Biochem. 46, 653, (1959)
56. Ebeling, W., Hennich, N., Klockow, M., Mek, H., Orth, H.O., and Lang H. Eur. J. Biochem. 47, 91, (1974)
57. Matsubara, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 427, (1966)
58. Desnuelle, P. in: The Enzymes (Boyer, P.D., Lardy, H., u. Myrbäck, K., eds), Academic Press, New York and London, 4, 93, (1960)
59. Maurer, H.R., Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u. Co. (1968)
60. Weber, K. und Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406, (1969)
61. Lambin, P., Rochu, D. and Fine, J.M., Anal. Biochem., 74, 567, (1976)
62. Reynolds, J.A. and Tanford, G., Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 1002, (1970)
63. Pitt-Rivers, R. und Impiobato, F.S.A., Biochem. J. 109 825, (1968)
64. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzym. Analyse, Weinheim, (1970)

65. Florini, J.R. und Vestling, C.S., *Biochim. Biophys. Ac.*, 25, 575, (1957)
66. Buckel, W., Eggerer, H., *Biochem. Z.* 343, 29, (1965)
67. Engeser, H.J., Wieland, F., und Lynen, F., *FEBS. Lett.* 82, 139, (1977)
68. Bonner, W.M., und Laskey, R.A., *Eur. J. Biochem.* 46, 83, (1974)
69. Bradford, M.M., *Analytical Biochemistry* 72, 248, (1976)
70. Warburg, O., Christian, W., *Biochem. Z.* 310, 384, (1942)
71. Sanger, F., *Biochem. J.* 44, 126-128, (1949)
72. Ellman, G.L. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70, (1959)
73. Hartley, B.S., *Biochem. J.*, 119, 805, (1970)
74. Gray, W.R., *Meth. in Enzym.* XXV, B, (Colowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 121, (1972)
75. Huber, R. *The Structure of the Pancreatic Trypsin Inhibitor, Conformation of Biological Molecules and Polymers, The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, V. The Israel Academy of Sciences and Humanities*, (1973)
76. Schwietz, H., Dietlein, G., Schlitz, E. und Schweizer, E., *Biochem. Biophys. A.* 453, 453, (1976)
77. Sampath Narayanan, A., und Anwar, R.A., *Biochem. J.*, 114, 11, (1969)
78. Blaschkowski, H.P., Knappe, J. und Wieland, Th., *FEBS Lett.* 98, 81, (1979)
79. White, H. und Jencks, W.P., *J. Biol. Chem.*, 251, 1708, (1975)
80. Ouchterlony, O., *Arkiv Kemi* 26 B, 14, 1, (1949)
81. Maschler, R., *Dissertation, Freie Universität Berlin*, (1973)
82. Schweizer, E., und Lynen, F., *In: Transport by Proteins, Multienzyme Complexes*, Walter de Gruyter, (1978).
83. Bayer, E., und Eggerer, H., *Eur. J. Biochem.*, 86, 203, (1978)
84. Ochoa, S., *Meth. in Enzym.* I (Colowick, S.P., und Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 688, (1955)

85. Eggerer, H., und Lynen, F., Biochem. Z. 335, 540, (1962)
86. Kunitz, M., Simms, H.G., J. gen. Physiol. 11, 641, (1928)
87. Kuhn, R., Quadbeck, G., Ber. 84, 844, (1951)
88. Majerus, E.W., Alberts, A.W., und Vagelos, P.R., Meth. in Enzym., XIV (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O. eds.) Academic Press, New York, 46, (1969)
89. Ziegenhorn, J. und Lynen, F., Meth. d. enzymat. Analyse (Bergmeyer, H.K., ed.) Weinheim, (1970)
90. Stadtman, E.R., J. Cell. Comparat. Physiol. 41, 89, (1953)
91. Laemmli, U.K., Nature 227, 680, (1970)
92. Lynen, F., in: Meth. in Enzym. V (Colowick, S.P., und Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 443, (1962)
93. Sumper, M., Oesterhelt, D., Riepertinger, C., Lynen, F., Eur. J. Biochem. 10, 377, (1969)
94. Schreckenbach, Th., Dissertation München, (1975)
95. Biochemica-Dienst, Fa. Boehringer Mannheim, No.29, (1975)
96. Seubert, W., in: Meth. d. enzymat. Analyse (Bergmeyer H.U., ed.) Weinheim, (1962)
97. Yphantis, D.A., Biochem., 3, 297, (1964)
98. Stoffel, W., Caesar, H. u. Ditzler, R., Hoppe-Seyler's Z. 339, 191, (1964)
99. Adickes, F., u. Andresen, G., Annalen, 555, 41, (1943)
100. Stadtman, E.R., Meth. in Enzym. III (Colowick, S.P., u. Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 931, (1957)
101. Drapeau, G.P., in: Meth. in Enzym. XLV B (Colowick, S.P., und Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 469, (1976)
102. Matsubara, H., in: Meth. in Enzym. XIX (Colowick, S.P., und Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York, 643, (1970)
103. Feinstein, G., Kupfer, A., und Sokolovsky, M., Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 4, 1020, (1973)
104. Sephadex-Gelfiltration theory and practice, Firmenschrift Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, (1971)

105. LKB-Ultrogel Bedienungsanleitung, Firmenschrift LKB, Gräfelting, (1977)
106. Bio-Rad Laboratories, Katalog D, (1978)
107. Bedienungsanleitung für Ampholine[®] PAGplate-Kit, pH 3,5 - 9,5 , LKB, Gräfelting, (1979)
108. Hirs, C.H.W., Meth. in Enzym. XI (Colowick, S.P., N.O. eds.) Academic Press, New York, 197, (1967)
109. Narita, K., Matsuo, H. und Nakajima, T., Protein Seq. Det., (Needleman, S.B., ed.), 2nd ed., Springer-Verlag Berlin, 42, (1975)
110. Engeser, H., Hübner, K., Straub, J., und Lynen, F., Eur. J. Biochem., 101, 407 und 413, (1979)
111. Schmitt, Th., Ringelmann, E., und Lynen, F., 12th FEBS-Meeting, Dresden, Abstr. 2920, (1978)

Lebenslauf

Ich wurde am 18. Februar 1949 in München geboren.

Meine Eltern sind der Chemiker Dr. rer. nat. Werner Schmitt und seine Ehefrau Elisabeth, geb. Borner.

1955 - 1959	Evangelische Volksschule Starnberg
1959 - 1960	Grundschule Landschulheim Abwinkel am Tegernsee
1960 - 1961	Oberrealschule Landschulheim Abwinkel am Tegernsee
1961 - 1962	Landschulheim Neubauern bei Rosenheim
1962 - 1970	Gymnasium Starnberg (naturwissenschaftlich-neusprachlich)
Juni 1970	Abitur
WS 1970	Beginn des Chemiestudiums an der Universität München
Oktober 1973	Diplom-Vorprüfung
April 1976	Diplom-Hauptprüfung
Juni 1976-	Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit
Okt. 1979	am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen und Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt.

Seit 1978 bin ich mit Margitta Peterke verheiratet.

